

Université de Sherbrooke

**Évaluation de l'activation des plaquettes dans le monitoring de l'utilisation des
antiplaquettaires au cours des syndromes coronariens aigus**

**Par
Faiza Fatima Boughrassa**

**Département de biochimie
Centre de recherche en évaluation et diagnostic
C.R.E.D**

**Mémoire Présenté à la Faculté de Médecine
En vue de l'obtention du grade de
Maître ès Science (M.SC.)
En sciences cliniques**

Juin 2004



National Library
of Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

Acquisitions et
services bibliographiques

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 0-612-94807-2

Our file Notre référence

ISBN: 0-612-94807-2

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this dissertation.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de ce manuscrit.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the dissertation.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

Université de Sherbrooke
Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé :

Évaluation de l'activation des plaquettes dans le monitoring de l'utilisation des
antiplaquettaires au cours des syndromes coronariens aigus

Présenté par :

Faiza Fatima Bougrassa

est évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Directeur de recherche : Dr Andrew Grant, département de biochimie,
Université de Sherbrooke
Codirecteur de recherche : Dr Jean-Pierre Tétrault, département d'anesthésie
Université de Sherbrooke
Examineurs internes : Dr Alain Vanasse, département de médecine de
famille, Université de Sherbrooke
Dr Michel Nguyen, département de cardiologie,
Université de Sherbrooke
Examineur externe : Dr Yahie Merhi, institut de cardiologie,
Université de Montréal

Pensées

« Il faut toujours lutter, pour une vie meilleure, pour une santé meilleure et pour le respect d'autrui et de soi »

Ma mère Zoulikha

Évaluation de l'activation des plaquettes dans le monitoring de l'utilisation des
antiplaquettaires au cours des syndromes coronariens aigus

Mémoire présenté à la faculté de médecine par Faiza Fatima Boughrassa en vue de
l'obtention du grade de Maître ès science (M.SC.) en sciences cliniques

Département de biochimie
Centre de recherche en évaluation et diagnostic
C.R.E.D
Avril 2004

RÉSUMÉ

Introduction : les syndromes coronariens aigus sont caractérisés par la formation d'un thrombus dans les artères coronariennes. Plusieurs études ont montré l'implication de l'activation plaquettaire dans la thrombose coronarienne et l'interaction cellulaire entre les plaquettes sanguines et les cellules inflammatoires. Pour mieux contrôler les phénomènes thrombotiques, de nouveaux médicaments ont été développés, avec des mécanismes d'actions différents, limitant la formation de thrombus au cours de l'intervention coronarienne percutanée et du syndrome coronarien aigu. Il serait intéressant de guider l'utilisation de ces antiplaquettaires par une méthode simple visant à quantifier directement le degré d'activation plaquettaire basale avant angioplastie et traitement ainsi que la réponse des plaquettes au traitement. Les résultats d'études préliminaires ont montré l'intérêt d'un nouveau

paramètre lié à la densité des plaquettes, le MPC (mean platelet component), mesuré par un instrument automatisé l'ADVIA 120, comparable au marqueur de référence, l'expression de la P-sélectine mesurée par la cytométrie de flux par immunofluorescence. Cependant, le problème méthodologique principal est l'activation *in vitro* des plaquettes induite durant les manipulations expérimentales.

Objectifs : La première partie de cette étude effectuée au laboratoire, consiste à étudier les conditions de mesures de l'activation des plaquettes *in vitro*. La seconde partie effectuée en clinique a pour objectif de valider le MPC comme paramètre mesurant l'activation plaquettaire, afin de déterminer la présence ou l'absence de plaquettes activées, dans une population de coronariens avant et après prise d'antiplaquettaires, en le comparant au marqueur de référence, le CD62P. Aussi, nous voulons évaluer la relation entre l'activation plaquettaire et le marqueur de l'inflammation, la protéine C réactive.

Méthodologie : La première étape consiste à comparer la capacité de différents anticoagulants à prévenir l'activation des plaquettes *in vitro*. La seconde étape est une étude prospective comparative de deux méthodes de mesure de l'activation plaquettaire, utilisant les marqueurs, MPC et CD62P, chez une population de coronariens qui reçoivent des antiplaquettaires selon un protocole thérapeutique élaboré lors d'une angioplastie, dans un contexte de syndrome coronarien aigu

principalement. Des prises de sang effectuées avant et après prise médicamenteuse et à des intervalles de temps différents sur une période de vingt quatre heures permettront d'étudier le comportement des plaquettes.

Résultats : Les résultats de l'étude indiquent que le CTAD (citric acid, théophylline, adénosine, dipyridamole) permet une meilleure prévention de l'activation plaquettaire *in vitro*. L'EDTA (éthylènediamine-tétraacétique) est un anticoagulant disponible au laboratoire qui donne aux plaquettes une stabilité acceptable, mesurée dans l'intervalle d'une heure. Dans l'étude clinique, l'évaluation de l'activation plaquettaire par l'expression de CD62P et le MPC a montré une corrélation entre les deux mesures, chez les patients coronariens ($r = -0.82$, $p < 0.001$). 44 patients ont été recrutés sous aspirine et des doses charges de clopidogrel (300 mg ; n=29) ou d'abciximab (0,25 mg/kg ; n=15). Deux groupes de patients ont été identifiés. Un premier groupe avec activation plaquettaire avant traitement (clopidogrel, n=11 ; abciximab, n=5) a répondu aux médicaments par l'inhibition de l'activation plaquettaire et un deuxième groupe sans activation plaquettaire avant traitement (clopidogrel, n=19 ; abciximab, n=10). Dans ce deuxième groupe, après traitement, certains patients (clopidogrel, n=15 ; abciximab, n=6) n'ont présenté aucun changement de l'état des plaquettes, chez d'autres patients (clopidogrel, n=4 ; abciximab, n=3), on a observé une activation plaquettaire, malgré le traitement. Ces résultats montrent l'hétérogénéité du comportement des plaquettes avant et après traitement, et la capacité du MPC à

détecter cette variation. Par ailleurs, la relation observée entre le MPC et la protéine C réactive montre l'implication physiopathologique de l'inflammation dans la survenue de la thrombose et par conséquent la relation entre l'inflammation et la fonction plaquettaire.

Conclusion : Ces résultats suggèrent l'utilité potentielle du MPC dans l'évaluation de l'état de la fonction d'activation des plaquettes avant traitement et dans la surveillance du traitement antiplaquettaire dans une population de coronariens. Le MPC nécessite une validation clinique future.

Mots clé :

Activation plaquettaire, densité plaquettaire, P-sélectine, protéine C réactive, antiplaquettaires

TABLE DES MATIÈRES

	page
RÉSUMÉ	I
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES ILLUSTRATIONS	X
Liste des tableaux	X
Liste des figures.....	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XIV
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 : RECENSION DES ÉCRITS.....	7
1. 1 Rôle de l'activation plaquettaire au cours des syndromes coronariens aigus.....	7
1. 2 Mécanisme physiopathologique de la thrombose coronarienne.....	11
1. 2. 1 Développement de la plaque d'athérome.....	12
1. 2. 1. 1 La dysfonction endothéliale.....	12
1. 2. 1. 2 Théorie inflammatoire.....	14
1. 2. 1. 3 Rupture de la plaque.....	20
1. 2. 2 Rappel physiologique sur l'activation des plaquettes sanguines.....	24
1. 2. 2. 1 Les plaquettes sanguines.....	24
1. 2. 2. 2 Adhésion des plaquettes.....	26
1. 2. 2. 3 Activation des plaquettes.....	28
1. 2. 2. 4 Sécrétion plaquettaire.....	32
1. 2. 2. 5 Agrégation des plaquettes.....	33
1. 2. 3 Manifestations cliniques de la thrombose coronarienne.....	36
1. 2. 4 Évolution du processus thrombotique.....	40
1. 2. 4. 1 Evolution locale.....	40
1. 2. 4. 2 Evolution à distance.....	42
1. 3 Marqueur de l'athérothrombose.....	44
1. 3. 1 Marqueur de l'inflammation.....	44
1. 3. 2 Marqueur de l'activation plaquettaire.....	46
1. 3. 2. 1 Expression de la P-sélectine (CD62P).....	46
1. 3. 2. 2 Mesure de la densité des plaquettes.....	48

1. 3. 3 Les marqueurs biochimiques des dommages myocardiques.....	49
1. 3. 3. 1 Myoglobine.....	50
1. 3. 3. 2 Créatines kinases et ses isoenzymes.....	50
1. 3. 3. 3 Troponines I et T.....	52
1. 4 Conduite thérapeutique au cours des SCA.....	55
1. 4. 1 Intervention coronarienne percutanée.....	55
1. 4. 2 Mécanismes inhibiteurs des fonctions plaquettaires.....	57
1. 5 Méthodes d'évaluation de l'activation plaquettaire.....	63
1. 5. 1 Procédures d'évaluation de l'activation des plaquettes <i>in vitro</i>	63
1. 5. 2 Les instruments de mesure.....	66
1. 5. 2. 1 La cytométrie de flux : technique d'immunofluorescence.....	67
1. 5. 2. 2 Le système hématologique automatisé: ADVIA 120 (Bayer Diagnostic).....	69
1. 6 Mesure de l'agrégation des plaquettes.....	72
1. 6. 1 L'agrégométrie.....	72
1. 6. 2 Le PFA-100.....	73
1. 7 Évaluation clinique.....	74
1. 8 Hypothèses de recherche et objectifs.....	80
1. 8. 1 Hypothèses de recherche.....	80
1. 8. 2 Objectifs de l'étude.....	82
1. 8. 2. 1 Objectif général.....	82
1. 8. 2. 2 Objectifs spécifiques.....	82
CHAPITRE 2 : MÉTHODOLOGIE	84
2. 1 Dispositif de l'étude.....	84
2. 2 Population à l'étude et recrutement.....	85
2. 2. 1 Définition de la population.....	85
2. 2. 2 Critères d'admissibilité.....	86
2. 2. 3 Stratégie de recrutement.....	87
2. 3 Instruments de mesures.....	89
2. 3. 1 Mesure de l'activation des plaquettes.....	89
2. 3. 1. 1 La cytométrie de flux : technique d'immunofluorescence.....	89
- Principe de mesure de la cytométrie de flux.....	90
2. 3. 1. 2 Le système hématologique automatisé ADVIA 120.....	91
- Principe de mesure de l'ADVIA 120.....	92
2. 3. 2 Mesure de l'agrégation des plaquettes par le système PFA-100.....	95
- Principe de mesure du PFA-100.....	95
2. 4 Déroulement de l'étude.....	96
2. 4. 1 Matériel.....	96

2. 4. 2	Procédures d'évaluation de l'activation des plaquettes.....	96
2. 4. 2. 1	Préparation des plaquettes.....	96
2. 4. 2. 2	Évaluation de l'effet de différents anticoagulants sur l'activation des plaquettes.....	97
-	Méthodes.....	98
-	Préparation des plaquettes isolées.....	98
-	Analyse par cytométrie de flux.....	99
-	Analyse par le système hématologique ADVIA 120.....	100
2. 4. 3	Évaluation de l'activation et de l'agrégation plaquettaire chez les patients sous antiplaquettaires	100
2. 4. 3. 1	Au lit du patient.....	100
2. 4. 3. 2	Le suivi des patient.....	103
2. 4. 3. 3	Caractéristiques des patients.....	103
2. 4. 3. 4	Au laboratoire.....	104
2. 4. 3. 4. 1	Contrôle de qualité de l'ADVIA 120.....	104
2. 4. 3. 4. 2	Analyse des spécimens de sang des patients sous antiplaquettaires.....	104
-	Analyse des spécimens de sang par le système automatisé ADVIA 120.....	105
-	Analyse des spécimens de sang par cytométrie de flux par immunofluorescence.....	105
-	Mesure de l'agrégation plaquettaire par le système PFA-100 ..	106
-	Mesure du compte des plaquettes par l'ADVIA 120.....	106
-	Analyse des spécimens de sérum.....	107
2. 4. 4	Collecte de données.....	107
2. 5	Contrôle des biais.....	108
2. 5. 1	Biais associés à la sélection des sujets.....	108
2. 5. 2	Biais associés à la mesure des effets.....	109
2. 5. 3	Biais associés à la généralisation des résultats.....	109
2. 6	Taille de l'échantillon.....	110
2. 7	Analyse des données.....	111
2. 8	Considérations éthiques.....	112
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS		113
3. 1	Évaluation de l'activation plaquettaire sous l'effet de différents anticoagulants, citrate de sodium, EDTA et CTAD.....	113
3. 1. 1	Mesure de l'activation plaquettaire dans le sang total.....	113
3. 1. 2	Mesure de l'activation sur les plaquettes isolées.....	118
3. 2	Évaluation de l'activation et l'agrégation plaquettaire chez les patients sous antiplaquettaires.....	121

3. 2. 1	La participation des sujets.....	121
3. 2. 2	Les caractéristiques des participants.....	123
3. 2. 2. 1	L'âge et le sexe.....	123
3. 2. 2. 2	Les caractéristiques cliniques.....	123
3. 2. 2. 2. 1	Le diagnostic.....	124
3. 2. 2. 2. 2	Médicaments interférant avec la fonction des plaquettes.....	124
3. 2. 2. 2. 3	Les antécédents personnels et familiaux.....	125
3. 2. 3	Mesure de l'activation plaquettaire.....	127
3. 2. 3. 1	Résultats du groupe clopidogrel.....	132
3. 2. 3. 2	Résultats du groupe abciximab.....	137
3. 2. 3. 3	Relation entre le MPC et l'expression de CD62P.....	142
3. 2. 4	Le suivi des patients.....	143
3. 2. 4. 1	Groupe des patients avec activation plaquettaire avant traitement	143
3. 2. 4. 2	Groupe des patients sans activation plaquettaire avant traitement.....	143
3. 2. 5	Mesure de l'agrégation plaquettaire.....	144
3. 2. 5. 1	Effet des antiplaquettaires sur l'agrégation des plaquettes.....	144
3. 2. 5. 2	Mesure de l'agrégation plaquettaire par le système PFA-100.....	147
3. 3	Relation entre l'activation plaquettaire et le marqueur de l'inflammation la PCR.....	148
3. 4	Relation entre l'activation plaquettaire et la troponine I.....	151
CHAPITRE 4 : DISCUSSION		152
4. 1	Étude de l'effet de différents anticoagulants sur l'activation des plaquettes <i>in vitro</i>	152
4. 2	Évaluation de l'état des plaquettes chez les patients coronariens avec traitement antiplaquettaire.....	154
4. 2.1	Aspects méthodologiques.....	155
4. 2. 1. 1	Population à l'étude.....	156
4. 2. 1. 2	Instruments de mesure.....	157
4. 2. 2	Discussion des résultats.....	158
4. 2. 2. 1	Évaluation de l'activation plaquettaire par l'expression de CD62P et le MPC.....	159
4. 2. 2. 1. 1	Groupe de patients avec plaquettes activées avant traitement.....	159
4. 2. 2. 1. 2	Groupe de patients sans activation plaquettaire avant traitement	162
4. 2. 2. 1. 3	Le suivi des patients.....	166
4. 2. 2. 1. 4	Relation entre le MPC et l'expression de CD62P.....	168
4. 2. 2. 2	Mesure de l'agrégation plaquettaire.....	169
4. 2. 2. 2. 1	Effet des antiplaquettaires sur le taux de plaquettes.....	169
4. 2. 2. 2. 2	Effet des antiplaquettaires sur l'agrégation des plaquettes.....	170

4. 2. 2. 3 Relation entre le MPC et la protéine C réactive.....	170
4. 2. 2. 4 Relation entre le MPC et la troponine I.....	174
4. 3 Forces et limites de l'étude.....	175
4. 4 Retombées anticipées.....	176
CONCLUSION.....	178
REMERCIEMENTS.....	182
RÉFÉRENCES.....	184
ANNEXES :	
ANNEXE I: Matériel.....	210
ANNEXE II: Formulaire de consentement du projet.....	211
ANNEXE III : Lettre d'acceptation du projet par le comité de déontologie de la recherche sur l'humain de l'Université de Sherbrooke.....	208

LISTE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3. 1 : Effet de la thrombine sur l'activation des plaquettes, mesuré dans le sang total avec le citrate de sodium, CTAD et EDTA, exprimé par le MPC mesuré par le système automatisé ADVIA 120 et le pourcentage de CD62P mesuré par la cytométrie de flux par immunofluorescence (les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type).....	115
Tableau 3. 2 : Effet de la thrombine sur l'activation des plaquettes isolées avec le CTAD et l'EDTA, exprimé par le MPC, mesuré par le système automatisé ADVIA 120 et par le pourcentage de CD62P, mesuré par la cytométrie de flux par immunofluorescence (les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type)	119
Tableau 3. 3 : Caractéristiques physiques et cliniques des participants	126
Tableau 3. 4 : Groupe clopidogrel (n=29), mesure des paramètres plaquettaires MPC par l'ADVIA 120 et le pourcentage de CD62P par la cytométrie de flux par immunofluorescence avant et après administration de clopidogrel. Les données sont présentées en moyenne \pm écart-type pour le MPC et le pourcentage de CD62P.....	129
Tableau 3. 5: Groupe abciximab (n=15), mesure des paramètres plaquettaires MPC par l'ADVIA 120 et le pourcentage de CD62P par la cytométrie de flux par immunofluorescence avant et après administration d'abciximab. Les données sont présentées en moyenne \pm écart-type pour le MPC et le pourcentage de CD62P.....	130
Tableau 3. 6 : Groupe de patients clopidogrel (n=11), avec plaquettes activées avant traitement, mesure des paramètres plaquettaires MPC par l'ADVIA 120 et le pourcentage de CD62P par la cytométrie de flux par immunofluorescence avant et après administration de clopidogrel. Les données sont présentées en moyenne \pm écart-type pour le MPC et le pourcentage de CD62P.....	132
Tableau 3. 7 : Groupe de patients clopidogrel (n=15) avec plaquettes non activées avant traitement, mesure des paramètres plaquettaires MPC mesuré par l'ADVIA 120 et le pourcentage de CD62P mesuré par la cytométrie de flux par immunofluorescence avant et après administration de clopidogrel. Les données sont présentées en moyenne \pm écart-type pour le MPC et le pourcentage de CD62P.....	134

Tableau 3. 8 : Groupe de patients abciximab (n=5), avec activation des plaquettes avant traitement, mesure des paramètres plaquettaires MPC par l'ADVIA 120 et le pourcentage de CD62P par la cytopénie de flux par immunofluorescence avant et après administration d'abciximab. Les données sont présentées en moyenne \pm écart-type pour le MPC et le pourcentage de CD62P.....	137
---	-----

Tableau 3. 9 : Groupe de patients abciximab (n=6), sans activation des plaquettes avant traitement, mesure des paramètres plaquettaires MPC mesuré par l'ADVIA 120 et le pourcentage de CD62P mesuré par la cytométrie de flux par immunofluorescence avant et après administration d'abciximab. Les données sont présentées en moyenne \pm écart-type pour le MPC et le pourcentage d'évènements positifs CD62P.....	139
---	-----

Tableau 3. 10 : Mesure du temps de fermeture (CT), par le PFA-100.....	147
--	-----

Tableau 3. 11 : Valeurs du MPC et de la PCR avant traitement. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type pour le MPC et la PCR.....	149
---	-----

Tableau 3. 12 : Relation entre l'activation des plaquettes et la PCR.....	150
---	-----

LISTE DES FIGURES

Figure 1. 1 : Interactions cellulaires au cours de l'athérogénèse ; rôle des différents médiateurs. (Source : Dr. Jérôme LÉONI. "Physiopathologie de l'athérosclérose - Mécanismes et prévention de l'athérothrombose." 2001).....	19
--	----

Figure 1. 2 : Adhésion plaquettaire au sous-endothélium (Source: Zitoun R, Samama MM, Marie JP. Manuel d'hématologie, 5 ^{ème} édition, 1998).....	28
--	----

Figure 1. 3 : Schéma simplifié du métabolisme des prostaglandines et de la formation du thrombus plaquettaire au cours de l'hémostase primaire.....	30
---	----

Figure 1. 4 : Vue extérieure d'une plaquettes sanguine au repos et activée après adhésion (Source: L'hémostase de Jobin François, 1 ^{ère} édition, 1995).....	31
--	----

Figure 1. 5 : Rôle du fibrinogène et du facteur de von Willebrand dans l'agrégation plaquettaire.....	34
---	----

Figure 1. 6: Mécanismes d'action des agents antiplaquettaires.....	60
--	----

Figure 2. 1: Principe d'analyse des plaquettes par le cytomètre analyseur l'ADVIA 120.....	94
Figure 2. 2: Analyse des plaquettes intégrée à celle des globules rouges.....	94
Figure 2. 3: Les différentes étapes d'évaluation du comportement des plaquettes	102
Figure 3.1: Effet de la thrombine sur l'activation des plaquettes, mesuré dans le sang total avec le citrate de sodium, CTAD et EDTA, exprimé par le MPC mesuré par le système automatisé ADVIA 120.....	116
Figure 3. 2 : Effet de la thrombine sur l'activation des plaquettes, mesuré dans le sang total avec le citrate de sodium, CTAD et EDTA, exprimé par le pourcentage de CD62P, mesuré par la cytométrie de flux par immunofluorescence.....	116
Figure 3. 3 : Corrélation entre les paramètres plaquettaires, MPC mesuré par l'ADVIA 120 et le pourcentage de CD62P, mesuré par la cytométrie de flux par immunofluorescence sur citrate de sodium.....	117
Figure 3. 4 : Effet de la thrombine sur l'activation des plaquettes isolées avec CTAD et l'EDTA, exprimé par le MPC mesuré par le système hématologique ADVIA 120.....	120
Figure 3. 5 : Effet de la thrombine sur l'activation des plaquettes isolées avec CTAD et l'EDTA, exprimé par le pourcentage de CD62P, mesuré par la cytométrie de flux par immunofluorescence.....	120
Figure 3. 6 : Participation des sujets à l'étude.....	122
Figure 3. 7a : Groupe de patients avec activation plaquettaire avant traitement et effet inhibiteur du clopidogrel, n=11. Les valeurs du MPC et de CD62P-PE sont exprimées en moyenne \pm SEM.....	133
Figure 3. 7b : Réponse individuelle de l'effet inhibiteur du clopidogrel sur l'activation plaquettaire observé, chez n=11 patients.....	133
Figure 3. 8a : Groupe de patients clopidogrel sans activation des plaquettes avant et après traitement, n=15. Les valeurs du MPC et de CD62P sont exprimées en moyenne \pm SEM.....	135

Figure 3. 8b : Patients du groupe de clopidogrel (n=15), sans activation plaquettaire avant et après traitement au clopidogrel.....	135
Figure 3. 9 : Absence d'activation des plaquettes avant traitement et présence d'activation après traitement au clopidogrel, n=3, exprimée par le MPC mesuré par l'ADVIA 120 (figure de gauche) et le pourcentage de CD62P mesuré par la cytopénie de flux par immunofluorescence (figure de droite)	136
Figure 3. 10a : Groupe de patients avec activation des plaquettes avant traitement et effet inhibiteur de l'abciximab, n=5. Les valeurs du MPC et de CD62P-PE sont exprimées en moyenne \pm SEM.....	138
Figure: 3. 10b : Réponse individuelle de l'effet inhibiteur de l'abciximab sur l'activation plaquettaire, n=5.....	138
Figure 3. 11a : Groupe de patients abciximab sans activation des plaquettes avant et après traitement, n=6. Les valeurs du MPC et de CD62P-PE sont exprimées en moyenne \pm SE	140
Figure: 3. 11b : Patients du groupe abciximab (n=6), sans activation plaquettaire avant et après traitement à l'abciximab.....	140
Figure 3. 12 : Absence d'activation des plaquettes avant traitement et présence d'activation plaquettaire après administration d'abciximab, n=4, exprimée par le MPC mesuré par l'ADVIA 120 (figure de gauche) et le pourcentage de CD62P mesuré par la cytopénie de flux par immunofluorescence (figure de droite)	141
Figure 3. 13 : Corrélation entre les paramètres plaquettaires, MPC mesuré par l'ADVIA 120 et le pourcentage de CD62P mesuré par la cytométrie de flux par immunofluorescence.....	142
Figure 3. 14 : Effet du clopidogrel sur le taux de plaquettes, n=29.....	146
Figure 3. 15 : Effet de l'abciximab sur le taux de plaquettes, n=14.....	146

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AI : Angine Instable

AA : Acide Arachidonique

ICP : Intervention Coronarienne Percutanée

ADP : Adénosine Diphosphate

ATP : Adénosine Triphosphate

CA : Calcium

CD62P : Cluster of Différenciation 62, Protein

CEPI : Collagène-épinephrine

CK : Créatine Kinase

CML : Cellules Musculaires Lisses

Cox-1 : Cyclooxygénase 1

Cox-2 : Cyclooxygénase 2

CTAD : Citrate-Théophylline-Adénosine-Dipyridamole

CT : Closure Time

EDTA : Éthylène Diamine Tétracétique

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FACSscan : Fluorescence Activated Cell Scanner

FITC : Isothiocyanate de Fluorescéine

GPIIb/IIIa : Glycoprotéine IIb/IIIa

GMP140 : Granule Membrane Protein140

IM : Infarctus du Myocarde

ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule-1

INF-g : Interféron g

IgG : Immunoglobuline G

LDL : Lipoprotéines à basse densité

MCS : Maladie Coronarienne Stable

M-CSF : Monocyte Colony Stimulating Factors

MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1

MGB : Myoglobine

MM-LDL : Mildly oxidized LDL

MMP : Matrix MetalloProteinase

MPC : Mean Platelet Component

PAC : Pontage Aorto-Coronarien

PAF : Platelet Activating Factor

PDGF : Platelet Derived Growth Factor

PF4 : Facteur 4 Plaquettaire

PFA : Platelet Function Analyzer

PE : Phycoérythrine

PCR : Protéine C Réactive

SCA : Syndromes Coronariens Aigus

SEM : Error to Standard mean

TGF β : Transforming Growth Factor bêta

TNF- α : Tumor Necrosing Factor- α : cytokine proinflammatoire

TIMPs : Tissue Inhibitor of MetalloProteinase

TnI : Troponine I

TnT : Troponine T

TXA₂ : Thromboxane A₂

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule

INTRODUCTION

Les syndromes coronariens aigus (SCA) qui regroupent angine instable (AI) et infarctus du myocarde (IM) sont caractérisés par la formation d'un thrombus dans les artères coronariennes (DAVIES et THOMAS, 1985 ; MIZUNO et al., 1992). Ces syndromes demeurent la principale cause d'hospitalisation et de décès au Canada et dans la plupart des pays développés. Plusieurs études ont mis l'accent sur le rôle majeur des éléments sanguins, notamment des plaquettes sanguines, dans le mécanisme de la thrombose coronarienne et spécifiquement au cours de l'AI et de l'IM (FRISHMAN et al., 1995 ; COULTER et al., 2000 ; RAUCH et al., 2001).

Les plaquettes jouent un rôle important autant dans l'hémostase primaire, en empêchant le saignement causé par une brèche vasculaire, que dans le développement des thromboses artérielles (DEL ZOPPO, 1998 ; BADIMON et al., 1998). À l'état physiologique, les plaquettes sanguines de forme discoïdale sont au repos ou inactivées. Dans certaines conditions, elles deviennent actives et entraînent la formation de caillots dans de petites artères du cœur, du cerveau ou des membres inférieurs avec des conséquences cliniques importantes. En effet, comme l'ont démontré de nombreuses études, un pourcentage élevé de plaquettes activées *in vivo* est considéré anormal et est associé à un risque thrombotique élevé dans différentes pathologies telles le diabète, les accidents cérébrovasculaires, l'insuffisance rénale, les

maladies inflammatoires et les SCA (CORASH et al., 1977 ; FITZGERALD et al., 1986; CAHILL et al., 1996 ; TSCHOEPE et al., 1997 ; SHROR, 1995 ; KNIGHT et al., 1997; ANDREWS et al., 1997).

S'il y a brèche endothéliale d'un vaisseau sanguin de petit calibre, des glycoprotéines exposées à la surface de la membrane plaquettaire favorisent l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium qui représente l'étape nécessaire au déclenchement de l'activation et l'agrégation plaquettaire. Ces étapes sont fondamentales dans la formation du thrombus coronarien survenant au cours des SCA et à la suite d'une dilatation ou intervention coronarienne percutanée (ICP), en raison du traumatisme infligé à l'artère et du corps étranger thrombogène (endoprothèse) introduit s'il y a lieu (ELLIS et al., 1988 ; Mc EVER, 1990 ; DE FEYTER et al., 1991 ; HAWINGER, 1994 ; SIXMA et al., 1997). L'utilisation d'un paramètre mesurant directement l'activation plaquettaire est utile dans le cadre des SCA.

L'ICP est devenue une approche thérapeutique courante dans le traitement des SCA. Le succès de cette technique de dilatation intravasculaire est limité par la resténose coronarienne durant les six premiers mois possiblement causée, en partie, par l'adhésion des plaquettes au site de dilatation peu de temps après l'intervention. La mise en place d'une endoprothèse, peut réduire la réapparition de la resténose à la suite d'une ICP, mais elle accroît aussi le risque de formation de caillots dans son site d'implantation. L'ICP est un terme général décrivant les procédures coronariennes percutanées incluant l'angioplastie coronarienne transluminale percutanée (ACTP),

l'ACTP avec endoprothèse et autres procédures. Ces complications peuvent être provoquées par un état préthrombotique préexistant ou par l'activation des plaquettes induite durant l'ICP (FUSTER et al., 1988 ; CHESEBRO et al., 1997). Par conséquent, des agents antiplaquettaires capables d'inhiber les fonctions d'activation et d'agrégation plaquettaires sont utilisés pendant et après l'ICP afin de prévenir la survenue de ces complications. Les antiplaquettaires actuellement disponibles sont : l'acide acétyl salicylique (AAS, aspirine), le dipyridamole, les thiénoxydines : ticlopidine et clopidogrel, et les antagonistes du récepteur plaquettaire glycoprotéique IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) comme le tirofiban, l'éptifibatide et l'abciximab. Leur efficacité a été démontrée sauf pour le dipyridamole ; cependant, ils peuvent être à l'origine de complications hémorragiques précoces en per et post-angioplastie. En effet, la crainte de majorer le saignement en poursuivant un traitement antiplaquettaire coexiste souvent avec celle de ne pas réduire assez efficacement le risque thrombotique artériel. Aussi, et compte tenu de la variabilité interindividuelle de sensibilité à certains antiplaquettaires, il devient intéressant de disposer d'un test biologique intégré à la routine pour surveiller en temps réel leur efficacité sur l'activation des plaquettes.

Cependant, en pratique, on note l'absence de méthodes simples visant à quantifier directement l'activation plaquettaire (STENBERG et al., 1985 ; LEGRAND et al., 1988 ; TSCHOEPE et al., 1993 ; ABRAMS et SHATTIL, 1991). Différentes approches sont utilisées et considérées comme peu sensibles. Leur valeur clinique demeure mal établie et aucun test biologique disponible n'est suffisamment

performant et adapté à une utilisation en routine pour envisager une évaluation systématique de l'activation plaquettaire, en partie à cause de la reproductibilité insuffisante des résultats et des dépenses de temps et d'équipement exigés. Parmi ces méthodes, il y a la numération plaquettaire qui est un examen faisant partie de tout bilan sanguin et plus spécifiquement l'hémogramme. Le temps de saignement qui est un test mesurant le temps d'arrêt du saignement d'une plaie cutanée superficielle. Ce test est sensible à la prise d'aspirine et aux anomalies plaquettaires quantitatives (thrombopénie) ou qualitatives (thrombopathie). Les résultats du temps de saignement sont influencés par plusieurs facteurs, à savoir : l'âge, la température du corps, la valeur de l'hématocrite (BRITISH SOCIETY FOR HAEMATOLOGY, 1988) et la variabilité dépendante de l'opérateur (DE CATERINA et al., 1994).

Les tests d'agréations nécessitent un agrégomètre qui est une technique mesurant l'agréation des plaquettes après addition de divers agents : thrombine, adénosine diphosphate (ADP), collagène, acide arachidonique, ristocétine. C'est une technique complexe non adaptée à la routine qu'on ne retrouve que dans des laboratoires spécialisés et qui nécessite des pools de plaquettes de témoins normaux. L'agréométrie par impédance électrique est une méthode précise utile dans la surveillance de l'utilisation de l'abciximab et d'autres antiplaquettaires (MASCELLI et al., 1997). Cet outil quantitatif et fiable sur la base d'un logiciel d'EAES (EDV-Online Acquisition and Evaluation System) approprié pour l'analyse mathématique (SCHREINER et al., 1991) nécessite un personnel qualifié. Aussi, la nécessité

d'assurer l'intégrité des électrodes avant chaque essai peut poser des problèmes dans la manipulation (NICHOLSON et al., 1998). L'essai est également moins fiable avec des concentrations inférieures en hémoglobine (THOMPSON et STEINHUBL, 1999).

Le Platelet Function Analyzer (PFA-100) est un test d'exploration globale de la fonction plaquettaire mesurant rapidement et quantitativement le temps de saignement « *in vitro* ». Il mesure le temps d'occlusion d'un capillaire recouvert de collagène/adrénaline. C'est une analyse relativement simple utilisée pour évaluer l'inhibition de l'agrégation des plaquettes par l'abciximab durant l'angioplastie (MADAN et al., 2002). Le temps d'occlusion est allongé en cas d'anémie, de thrombopénie, de thrombopathie et de prise d'aspirine. Bien qu'il semble plus sensible que le temps de saignement à la prise d'aspirine et aux inhibiteurs de la GPIIb/IIIa, aucune étude n'a pour l'instant démontré que les résultats du PFA-100 étaient prédictifs du risque hémorragique lié à la prise d'antiplaquettaires. Ce test est surtout utile au diagnostic de la maladie de Von Willebrand. Il est utilisé dans cette étude pour évaluer l'effet inhibiteur de l'abciximab sur la voie finale de l'agrégation plaquettaire.

Quant aux tests explorant l'activation des plaquettes, la cytométrie de flux par immunofluorescence est citée dans la littérature comme une technique de référence. Elle peut-être utilisée pour mesurer la réactivité plaquettaire, les plaquettes activées circulantes, les agrégats plaquettes-plaquettes et les agrégats leucocytes-plaquettes (MICHELSON et al., 2000). Elle reconnaît l'activation plaquettaire par l'expression d'une glycoprotéine membranaire des granules alpha des plaquettes au repos,

la P-sélectine ou CD62P, exprimée à la surface de la membrane des plaquettes activées (STENBERG et al., 1985 ; ABRAMS et SHATTIL, 1991). Cependant cette technique coûteuse et laborieuse est loin d'être la plus simple.

Par ailleurs, le problème méthodologique principal est l'activation *in vitro* des plaquettes induite pendant le prélèvement et durant les manipulations expérimentales. Par conséquent, on peut confondre cette activation *in vitro* avec une activation plaquettaire *in vivo* (GEORGE et al., 1981). L'évaluation de l'activation des plaquettes comme outil clinique courant exige donc des méthodes automatisées sensibles et simples d'utilisation qui ne nécessitent pas trop la manipulation des plaquettes.

Des études préliminaires ont attiré l'attention sur un nouveau paramètre plaquettaire, le MPC (Mean platelet component), mesuré par le système hématologique automatisé, l'ADVIA 120. Elles ont montré que le MPC reflète les changements liés à la libération du contenu des granules denses et alpha lors de l'activation plaquettaire et pourrait être utilisé en routine pour évaluer certains désordres plaquettaires (MACEY et al., 1999 ; CHAPMAN et al., 2003 ; AHNADI et al., 2003). De plus, cette technique automatisée ne nécessite pas la manipulation des plaquettes, ce qui réduit possiblement l'activation plaquettaire *in vitro*.

Cette étude veut dans un premier temps, étudier les conditions de mesure de l'activation des plaquettes et dans un deuxième temps, utiliser le MPC dans la mesure de l'activation plaquettaire basale et dans l'évaluation de la réponse au traitement antiplaquettaires dans une population de coronariens.

CHAPITRE 1 : RECENSION DES ÉCRITS

1. 1 Rôle de l'activation plaquettaire au cours des syndromes coronariens aigus

Le postulat selon lequel l'occlusion coronarienne thrombotique est le phénomène physiopathologique sous-jacent dans l'ischémie coronarienne aiguë a été élaboré au début du vingtième siècle. À l'époque, on pensait que l'IM était provoqué par une fissure de l'intima souvent associée à l'hémorragie de dissection de la plaque d'athérome (HERRICK, 1912 ; BENSON, 1926 ; SAPHIR et al., 1935). Plus tard, Paterson pensait que la rupture capillaire dans la plaque était responsable de l'hémorragie sub-endothéliale due à la fissure de l'intima (PATERSON, 1938).

Au milieu des années soixante, Chapman avait démontré la présence de thrombus coronariens dans la majorité des cas et Hampton avait proposé pour la première fois le concept selon lequel l'occlusion coronarienne résultait de la croissance murale d'un thrombus coronarien (CHAPMAN, 1965 ; HAMPTON, 1969).

Plusieurs années plus tard, Folts et collaborateurs avaient démontré sur un modèle canin que la sténose coronarienne sévère était associée à des dommages endothéliaux, avec réduction importante et cyclique du flux sanguin, suivie d'un retour brutal et spontané. Ces variations de flux cycliques semblaient être dues à la formation et à la désintégration passagère d'un thrombus, suite à l'administration d'aspirine (FOLTS et al., abstract 1976). L'introduction de la cathétérisation cardiaque avait permis de

montrer la présence d'un thrombus chez les patients présentant des symptômes et des signes d'ischémie myocardique à l'électrocardiogramme. Ceci avait confirmé la théorie selon laquelle l'occlusion thrombotique aiguë était la cause de l'IM (DE WOOD, abstract 1980).

Davies et ses collaborateurs ont montré lors d'autopsies de sujets décédés d'une cardiopathie ischémique que l'on retrouvait dans 95% des cas des lésions coronaires aiguës sur une centaine de cœurs testés et dans 74% des cas, on retrouvait des thrombus principalement non occlusifs mais identiques à ceux observés dans l'AI (DAVIES et THOMAS, abstract 1984). Par la suite, ils ont montré que les lésions artérielles focales, en particulier les plaques d'athérome fissurées, sont à l'origine du processus thrombotique (DAVIES et THOMAS, 1985).

Fitzgerald et collaborateurs ont étudié la relation entre l'activation plaquettaire et l'ischémie myocardique chez les patients avec AI. Pour cela, ils ont évalué la biosynthèse du thromboxane A₂ (substance la plus proagrégante) et de la prostacycline (substance anti-agrégante) par l'analyse physico-chimique des métabolites dans le plasma et l'urine chez les patients avec maladie coronarienne stable et instable. La biosynthèse de prostacycline est nettement élevée chez les patients présentant l'IM et corrèle avec la créatine kinase plasmatique ($r = 0,795$; $P < 0.001$). Ils ont observé également la plus grande élévation de synthèse de thromboxane A₂ chez les patients présentant l'AI. La biosynthèse de prostacycline pendant de tels épisodes peut être une réaction compensatoire de l'endothélium vasculaire qui limite le

degré ou les effets de l'activation des plaquettes. Ceci démontre que les plaquettes sont activées durant l'ischémie spontanée chez les patients présentant l'AI (FITZGERALD et al., 1986). Les examens angiographiques et angioscopiques ont confirmé l'implication du thrombus dans la survenue des SCA (MANDELKORN et al., 1983 ; SHERMAN et al., 1986).

Plus tard Smalling et Vernon montrent une corrélation significativement positive entre la sévérité de l'AI et la présence d'un thrombus coronarien à la suite d'études angioscopiques. Les plaques instables causant les syndromes ischémiques aigus ont une incidence très élevée de rethrombose précoce dans les quarante huit premières heures. Ces plaques restent fréquemment actives et sont sujettes à une plus grande incidence continue d'événements thrombotiques défavorables dans un délai supérieur ou égal à trente jours (SMALLING et VERNON, 1998).

Le rôle des plaquettes dans les SCA est bien documenté (FRISHMAN et al., 1995 ; COULTER et al., 2000 ; RAUCH et al., 2001). L'activation plaquettaire évaluée par l'expression de la P-sélectine ou l'agrégation plaquettaire *in vitro* est associée à l'augmentation de l'incidence de l'AI et de l'IM et de la mortalité. Elle est considérée comme un marqueur d'événements coronariens (WEISS, 1980 ; FITZGERALD et al., 1986 ; TRIP et al., 1990 ; SCHULTHEISS et al., 1994 ; FURMAN et al., 1998 ; AULT et al., 1999). Ault et collaborateurs ont montré que l'activation des plaquettes persiste jusqu'à trente jours après avoir la survenue de SCA. Ceci appuie l'importance des plaquettes dans l'origine de l'événement ischémique

initial aussi bien que dans n'importe quel événement récurrent (AULT et al., 1999). Les plaquettes s'activent au cours de la thrombolyse (BIHOUR et al., 1995) et de l'angioplastie (SCHARF et al., 1992), elles peuvent être également impliquées dans le développement de l'athérosclérose (GOLDBERG et STEMERMAN, 1980 ; IP et al., 1991). Les mécanismes inflammatoires et thrombotiques sont étroitement liés et contribuent à obstruer la lumière vasculaire (AZAR et al., 1997).

Par ailleurs, l'étude prospective de Tschoepe et collaborateurs a évalué l'activation plaquettaire par la méthode d'immunofluorescence, la cytométrie de flux en utilisant des protéines d'adhésion comme la thrombospondine, CD62P (P-sélectine) et CD63 (GP53). Elle montre que ces marqueurs membranaires de l'activation des plaquettes sont associés aux résultats cliniques précoces survenant après ICP élective. La prévalence globale des événements ischémiques précoces après ICP (5,9%) est similaire dans d'autres études chez les patients avec un taux élevé de plaquettes activées (DETRE et al., 1990 ; DE FEYTER et al., 1991 ; TSCHOEPE et al., 1993).

Dès lors, de nombreuses études ont démontré l'implication du thrombus plaquettaire dans la physiopathologie des SCA. Il est donc important de disposer de marqueurs évaluant directement la fonction plaquettaire afin d'évaluer le risque de complications que peut engendrer l'activation des plaquettes.

1. 2 Mécanisme physiopathologique de la thrombose coronarienne

Les SCA ont un substrat anatomique commun, en effet, des observations anatomopathologiques , angioscopiques et biologiques ont démontré que l'AI et l'IM sont deux tableaux cliniques différents qui résultent d'un mécanisme physiopathologique sous-jacent commun : à savoir, la rupture ou l'érosion de la plaque d'athérome s'accompagnant d'inflammation, de thrombose avec des degrés variables de thrombose et d'embolisation distale surajoutées (DAVIES et al., 1993 ; DAVIES, 1997).

L'athérosclérose représente une des causes majeures du développement des SCA. Une des principales caractéristiques de cette maladie est le développement d'une zone d'épaississement de la paroi de l'artère coronaire: la plaque d'athérome dont les mécanismes participant à sa formation restent encore à l'étude. L'événement déclenchant des thromboses artérielles est la rupture ou l'érosion de la plaque d'athérome. Après la rupture de cette plaque, trois étapes sont décrites : l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium, l'activation et l'agrégation plaquettaire aboutissant à la formation d'un thrombus, ce processus est appelé athérothrombose. Si le rôle de l'hémostase dans le développement de la plaque est encore débattu, sa participation aux phénomènes thrombotiques artériels est établie.

1. 2. 1 Développement de la plaque d'athérome

Le développement de l'athérosclérose est un processus lent au cours duquel les artères s'épaississent suite à un dépôt progressif de lipoprotéines à basse densité (LDL) riches en cholestérol (NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM, 1993). La première étape de l'athérosclérose est la pénétration passive et l'accumulation des LDL dans l'intima. Cette infiltration lipidique est suivie d'une modification oxydative des LDL par des mécanismes notamment enzymatiques, il en résulte une dysfonction endothéliale.

1. 2. 1. 1 La dysfonction endothéliale

La paroi des artères est composée de deux couches cellulaires principales : l'endothélium et les cellules musculaires lisses (CML). L'endothélium a un triple rôle de barrière, de protection contre la thrombose et de fabricant d'informations destinées aux CML. Ces informations sont véhiculées par de petites molécules synthétisées par l'endothélium en particulier lorsque le débit artériel augmente. La principale de ces molécules est le monoxyde d'azote qui transmet l'information aux CML de se contracter ou de se relâcher. Le monoxyde d'azote est synthétisé par l'enzyme endothéliale monoxyde d'azote-synthétase (NO-synthétase) et aussi libéré par les forces de cisaillements élevées (JOANNIDES et al., 1995), ce qui entraîne une

vasodilatation (PALMER et al., 1988). Le tonus des vaisseaux normaux dépend étroitement d'un endothélium intact. Normalement le monoxyde d'azote empêche l'adhésion et la migration des leucocytes au niveau de la membrane artérielle. Il inhibe également la prolifération des CML des vaisseaux et a un effet antithrombotique (FICHTLSCHERER et al., 2000). La présence de LDL oxydées est à l'origine du dysfonctionnement de l'endothélium qui se caractérise par un déficit en substance favorisant la vasodilatation et une baisse de la relaxation des CML. La dysfonction endothéliale, fait intervenir une carence en monoxyde d'azote, et entraîne des réactions essentiellement de vasoconstriction coronaire anormale (spasme) À l'occasion de stimuli, une agrégation plaquettaire et des interactions endothélium-leucocytes (CAYATTE et al., 1994). La dysfonction endothéliale favorise l'adhésion des monocytes au niveau de l'endothélium. Ces monocytes pénètrent l'espace sous-endothéliale et se transforment en macrophages sous l'influence de différents facteurs, lesquels captent préférentiellement les LDL oxydées ce qui constitue une étape importante de l'athérogénèse dans la mesure où ces macrophages vont induire une réaction inflammatoire chronique locale et produire des cytokines pro-inflammatoire qui vont générer à la fois la croissance de la plaque, et sa fragilisation. La plaque d'athérome formée comporte un noyau riche en cholestérol, entouré par une coque de tissu fibreux. Elle peut rester silencieuse plusieurs mois ou années ou se compliquer brutalement d'une thrombose qui révèle la maladie. Plusieurs théories physiopathologiques ont été avancées : métabolique (rôle du LDL-cholestérol),

infectieuse (agents infectieux comme le cytomégalovirus ou *Chlamydia pneumoniae*) et enfin, plus récemment, inflammatoire.

1. 2. 1. 2 Théorie inflammatoire

La théorie inflammatoire est la plus satisfaisante et représente un canevas pathogénique unificateur des théories métaboliques et infectieuses. La réaction inflammatoire est un ensemble de mécanismes physiologiques de défense visant à circonscrire et à réparer les lésions tissulaires de causes multiples. Dans le cas des SCA, il s'agit d'une infiltration du sous endothélium vasculaire de LDL oxydées ; la réaction inflammatoire qui découle de leur formation, va assurer l'évolution de la plaque. Le recrutement des cellules inflammatoires est essentiel pour la poursuite du processus. Une fois initiée, cette réaction inflammatoire pourra soit régresser, soit s'amplifier (voire s'autoamplifier). La première étape de ce processus inflammatoire est la dysfonction endothéliale dont les facteurs sont l'augmentation des LDL oxydées, le diabète, la présence de radicaux libres (induits par le tabagisme) ou des facteurs infectieux (infection par *Chlamydia pneumoniae* ou cytomégalovirus). L'autre phénomène pathologique majeur est la migration des CML de la média à l'intima où elles se mettent à proliférer et à produire de la matrice extracellulaire riche en collagène. On peut diviser l'évolution de la plaque athérome en différentes étapes : (TURPIN et BRUCKERT, 1994 ; COHEN, 1997 ; HENNEN, 1996).

1. Pénétration des LDL au niveau de l'intima.
2. Oxydation de ces LDL.
3. Activation des cellules endothéliales par les LDL oxydées avec expression des récepteurs membranaires et sécrétion de messagers solubles.
4. Adhésion des monocytes à l'endothélium et pénétration au niveau de l'intima.
5. Formation des cellules spumeuses à partir des macrophages et des CML.
6. Prolifération et migration de ces CML de la média vers l'intima.
7. Sécrétion de collagène, de fibres élastiques et de protéoglycannes par les CML.
8. Accumulation de tissu conjonctif, de lipides, de CML et de cellules spumeuses.
9. Formation du noyau lipidique à partir des éléments lipidiques accumulés.
10. Ulcération de la paroi vasculaire et mise à nu du sous-endothélium.
11. Adhésion et activation plaquettaire provoquant une thrombose.

Les différentes étapes décrites précédemment ne suivent pas - en réalité - rigoureusement cet ordre chronologique. Nombre d'entre elles sont fortement imbriquées les unes dans les autres ; la séquence présentée ici veut représenter une certaine << dynamique >> de l'évolution de la plaque, mais ne tente en aucune façon de détailler les mécanismes intimes de ce phénomène. La conséquence de l'infiltration des LDL est l'accumulation des cellules spumeuses au niveau de l'intima conduisant à la formation d'un noyau lipidique et le centre athéromateux est recouvert d'une chape fibreuse (BERLINER et al., 1995) ; en périphérie on retrouve la sécrétion d'une matrice extracellulaire fibreuse. Steinberg et Lewis ont montré que les phénomènes de

thrombose survenaient essentiellement sur des plaques fibreuses contenant un important noyau lipidique et recouvertes d'une fine couche fibreuse (STEINBERG et LEWIS, 1997).

Les cellules endothéliales sont les premières cellules au niveau de la paroi vasculaire à être impliquées dans le processus d'athérogénèse. Leur activation se fait par les LDL oxydées, et concerne l'expression de récepteurs membranaires comme :VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) et ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1) qui jouent un rôle important dans l'attachement et la migration des leucocytes à travers l'endothélium. L'adhésion des monocytes aux cellules de la paroi artérielle entraîne leur activation (récepteurs ICAM-1 et VCAM-1) (HWANG et al. 1997) et par sécrétion de M-CSF (Monocyte Colony Stimulating Factors) et de MCP-1(Monocyte Chemoattractant Protein-1), elles sont capables d'amplifier leur propre recrutement et d'entretenir la réaction inflammatoire (CUSHING et FOGELMANN, 1992). Les taux de P-sélectine (molécule d'adhésion) retrouvée en grande quantité au niveau des lésions, sont augmentés par les LDL oxydées (BERLINER et al., 1995). Les cellules endothéliales sécrètent les M-CSF et MCP-1 sous l'action des MM-LDL (Mildly oxidized LDL), plus précisément la lysophosphatidylcholine (produit de l'oxydation des LDL) (STEINBERG et LEWIS, 1997). Ces deux facteurs facilitent le développement de la lésion par recrutement des monocytes et facilitent leur transformation en macrophages tissulaires.

Le PAF (Platelet Activating Factor) est un phospholipide doté de propriétés proinflammatoires et thrombogènes. Synthétisé de novo lors de l'activation des plaquettes à partir des phospholipides membranaires, c'est un médiateur proinflammatoire très ubiquitaire provoquant la contraction des CML et agissant comme un facteur de perméabilité vasculaire. Il existe au sein des LDL oxydées des molécules analogues au PAF (PAF-like), celles-ci confèrent aux LDL oxydées la propriété d'initier et d'entretenir la réaction inflammatoire au niveau de la paroi artérielle. Elles provoquent par l'existence d'un récepteur PAF sur les monocytes une augmentation de synthèse d'INF-g (Interféron g ; responsable de l'activation des cellules immunocompétentes) et de TNF-a (Tumor Necrosing Factor-a : cytokine proinflammatoire) (FROSTEGARD et al., 1997).

Après adhésion des monocytes à l'endothélium, il y a sécrétion d'interleukines-1 et 6 (cytokines proinflammatoires). La sécrétion d'interleukine-1 est aussi stimulée par la présence de lipides oxydés (BERLINER et al. 1995). Les macrophages sont responsables d'une activité sur la matrice extracellulaire de la plaque. La stabilité de la trame de collagène de la matrice est la conséquence d'un équilibre entre les enzymes qui la dégradent et les inhibiteurs de ces enzymes :

- L'activation des macrophages entraîne une augmentation de sécrétion des MMP (Matrix MetalloProteinase), enzymes de dégradation (WESLEY et al., 1998).
- Cette activité MMP est régulée par la sécrétion de divers TIMPs (Tissue Inhibitor

of MetalloProteinase) dont il existe plusieurs types et dont les origines sont encore mal définies (macrophages, CML...) (FABUNMI et al., 1998).

La plaque d'athérome formée induit le durcissement de la paroi artérielle. Celle-ci devient incapable de se contracter: le flux sanguin est ralenti, car il n'est plus correctement chassé. Il se crée ainsi des turbulences et des stases sanguines localisées qui favorisent l'activation plaquettaire. Ce processus peut conduire à la formation d'un thrombus (Figure 1. 1).

1. 2. 1. 3 Rupture de la plaque

Tout au long de sa formation, la plaque d'athérome connaît une évolution longtemps asymptomatique. Le cœur lipidique de la plaque est constitué de lipides extra et intra-cellulaire isolés de la lumière artérielle par la chape fibreuse constituée de CML, de collagènes et de la matrice extracellulaire. Cette chape fibreuse est donc un facteur de stabilité de la plaque d'athérome (MACHECOURT, 2002). Les éléments suivants, diversement regroupés, peuvent être à l'origine d'une rupture de plaque. La rupture active est probablement liée à la sécrétion d'enzymes protéolytiques par les macrophages, pouvant affaiblir la capsule fibreuse. La rupture de la plaque passive est liée à des forces physiques qui interviennent au point le plus faible de la capsule fibreuse, correspondant largement à sa partie la plus mince, à la jonction de la plaque et de la paroi « normale » adjacente. La vulnérabilité de la plaque peut dépendre de la tension pariétale circonférentielle, ainsi que de l'emplacement, des dimensions et de la composition du noyau lipidique et de l'impact du flux sur la surface luminale de la plaque (FUSTER V, 1994). C'est l'érosion - voire la rupture - de la chape fibreuse recouvrant cette plaque qui va conduire à la survenue d'un événement thrombotique. L'évolution vers la complication (rupture, érosion, hémorragie) ne dépend pas seulement du volume de la plaque mais de trois facteurs : la taille du noyau lipidique de la plaque, les modifications de la matrice extracellulaire et le degré d'inflammation locale (qui peut dégrader la chape fibreuse du noyau lipidique). Les plaques sujettes à

se rompre possèdent un noyau lipidique important, une faible densité de CML, une haute densité de macrophages, un collagène mince, désorganisé au niveau de la capsule fibreuse, et une importante concentration de facteur tissulaire (LIBBY, 2001). L'infiltration de macrophages a été mise en évidence de façon constante dans les études anatomopathologiques : leur proportion est six à neuf fois supérieure dans les plaques rompues par rapport à celles qui sont stables (MORENO et al., 1994). La présence de macrophage reflète un processus inflammatoire que caractérise aussi la présence de lymphocytes T activés au site de rupture de la plaque. Ces lymphocytes T sont capables de libérer diverses cytokines qui activent les macrophages et facilitent la prolifération des CML (LIBBY, 1995). La capsule fibreuse a normalement une concentration élevée de collagène de type I et peut supporter une forte contrainte de tension sans se briser. Elle représente une structure dynamique avec un équilibre continu entre la synthèse du collagène modulée par les facteurs de croissance et sa dégradation par des métalloprotéases dérivées de macrophages activés. En outre, l'apoptose des cellules musculaires peut affaiblir le tissu de la capsule (LIBBY, 1995) et favoriser une rupture de plaque. Le plus simple indicateur de vulnérabilité d'une plaque est sa composition relative en lipides et en tissu fibreux. Les plaques les plus vulnérables (et donc à plus haut risque de rupture), sont celles qui comportent un centre lipidique important et une chape fibreuse relativement fine. Par contre, les plaques les moins vulnérables, c'est à dire celles qui ont un faible risque d'évoluer vers un accident aigu, ont généralement un centre lipidique de petite taille isolé de la

lumière vasculaire par une chape fibreuse épaisse. La capsule fibreuse, composée de CML et d'une matrice extracellulaire, conditionne la résistance de la plaque. En somme, la vulnérabilité de la plaque va dépendre de la cellularité et de la qualité de la matrice extracellulaire de la chape qui la recouvre. Deux aspects sont importants à considérer : les mécanismes qui règlent la production de matrice extracellulaire et ceux qui en contrôlent la dégradation. La matrice extracellulaire de la partie fibreuse de la plaque est essentiellement produite par les CML qui ont migré et proliféré dans l'intima vasculaire. Diverses cytokines semblent pouvoir réguler la production de matrice extracellulaire et en particulier de collagène par les CML, alors que le TGF β (Transforming Growth factor bêta) augmente la production de collagène et l'INF-g produit par les lymphocytes T l'inhibe. Une augmentation de la production d'INF-g par les lymphocytes de la plaque pourrait donc augmenter le risque de rupture. Au sein de la plaque d'athérome, la dégradation de la matrice extracellulaire est sous le contrôle des MMP qui sont sécrétées par de nombreuses cellules de la plaque, essentiellement par les macrophages situés en périphérie du centre lipidique et qui en partie sont neutralisées par d'autres protéines, les inhibiteurs des MMP. Il existe donc à l'intérieur de chaque plaque un équilibre complexe entre les MMP et leurs inhibiteurs qui détermine l'activité protéolytique existant au sein de la lésion. Lorsque l'activité va franchement dans le sens d'une protéolyse, il y a possibilité de fragilisation de la matrice extracellulaire de la chape fibreuse favorisant la rupture. Lorsque l'on compare la composition des plaques d'athérome responsables des SCA (plaques instables) avec

celle de plaques stables, les plaques instables contiennent plus de macrophages que les lésions stables (GALIS et al., 1994). Les lymphocytes T activés peuvent stimuler la production de MMP par des macrophages au niveau des lésions, qui favorise l'instabilité de la plaque et implique plus loin une immuno-réaction (SCHONBECK et al., 1997). L'accumulation de macrophages peut être associée aux plus grandes concentrations plasmatiques de fibrinogène et de la protéine C réactive (PCR) (RIDKER et al., 1997 ; TOSS et al., 1997), deux marqueurs de l'inflammation considérés comme des signes précoces de l'athérosclérose (BERK et al., 1990 ; LEVENSON et al., 1995 ; RIDKER et al., 1997).

Van der Wal et collaborateurs ont examiné la relation entre la thrombose, la fissure de la plaque d'athérome et l'aspect histologique de plaques d'athérome coronariennes rompues de patients décédés d'IM. Des macrophages et des lymphocytes T sont le type cellulaire activé retrouvé en grande proportion indiquant l'inflammation continue au site de la rupture de la plaque. Ceci suggère que l'inflammation joue un rôle déstabilisant du tissu fibreux, augmentant ainsi le risque d'IM (VAN DER WAL et al., 1994). Une autre étude de Van der Wal et collaborateurs a montré grâce à l'analyse immunohistochimique, une augmentation du pourcentage du récepteur de l'interleukine 2 (CD25) des lymphocytes T positifs au niveau des lésions chez les patients avec SCA (VAN DER WAL et al., 1998).

L'intérêt de développer les différentes étapes de la formation d'une plaque d'athérome est de montrer que l'inflammation et la thrombose sont des processus

physiopathologiques étroitement liés avec une activation cellulaire impliquant principalement des interactions complexes entre des plaquettes, des leucocytes et des cellules endothéliales. Les cellules inflammatoires locales peuvent produire et libérer des cytokines qui peuvent activer l'endothélium, transformant ses propriétés physiologiques antiadhésives et anticoagulantes. En outre, les cytokines peuvent réduire la synthèse de matrice et augmenter sa dégradation, favorisant la rupture de plaque.

Les facteurs systémiques et l'inflammation contribuent à l'altération des voies hémostatiques de la coagulation et peuvent jouer un rôle dans le déclenchement de la thrombose intermittente qui est caractéristique de l'AI (CERMAK et al., 1993; RIDKER et al., 1998). Les réactifs de la phase aiguë inflammatoire, les cytokines, les infections chroniques, et les montées subites de catécholamines, peuvent représenter un stimulus systémique de l'activité procoagulante ou de l'hyperagréabilité des plaquettes (CANNON et al., 1997).

1. 2. 2 Rappel physiologique sur l'activation des plaquettes sanguines

1. 2. 2. 1 Les plaquettes sanguines

La plaquette est une cellule anucléée de 2 à 4 μm de diamètre, issue de la moelle osseuse et provenant de la fragmentation cytoplasmique d'une cellule souche, le mégacaryoblaste. Le maintien de la forme de la plaquette au repos est assuré par la

présence d'un réseau circulaire de microtubules formés de tubuline, tandis que l'actine et la myosine lui permettent de se contracter et de changer de forme. Les plaquettes sont des éléments cellulaires en forme de disque, comportant un faisceau de microtubules sous leur membrane et un système de canalicules ouvert à leur surface

Le rôle principal des plaquettes sanguines est d'assurer l'hémostase primaire, qui représente l'ensemble de phénomènes physiologiques qui concourent à l'arrêt du saignement, à la prévention des saignements spontanés et des thromboses. L'hémostase est un système qui s'active après une lésion de l'endothélium vasculaire pour éviter à la fois toute hémorragie importante et toute thrombose extensive (ZITOUN et al., 1998). Les plaquettes sont essentielles à l'arrêt du saignement mais participent aussi à la cicatrisation et à l'inflammation ; elles assurent ces fonctions grâce, notamment, à leurs capacités sécrétrices, c'est-à-dire la libération du contenu de leurs granules de stockage suite à l'activation plaquettaire (CRAMER, 1999). On distingue trois catégories de granules de stockage plaquettaires : les granules denses, les lysosomes et les granules alpha.

- Les granules denses stockent de petites molécules comme la sérotonine, le calcium, le pyrophosphate, l'ADP, l'adénosine triphosphate (ATP).
- Le contenu des lysosomes plaquettaires est essentiellement constitué d'enzymes comme la cathepsine, la bêta-hexosaminidase ou l'héparinase.
- Dans les granules alpha, sont stockées les protéines fondamentales pour les fonctions plaquettaires : des facteurs de croissance (TGF β , PDGF : platelet derived growth

factor...), des protéines d'adhésion (facteur de Von Willebrand, fibronectine...) et des protéines de l'inflammation dont le facteur 4 plaquettaire ou la bêta-thromboglobuline (SMITH et al., 1997). La protéine transmembranaire P-sélectine, qui est localisée majoritairement dans la membrane des granules alpha est un marqueur de la fusion du granule alpha avec la membrane plaquettaire ; elle est exposée à la membrane plasmique du mégacaryocyte et de la plaquette lors de l'exocytose.

1. 2. 2. 2 Adhésion des plaquettes

La paroi vasculaire est séparée du sang circulant par une couche monocellulaire de cellules endothéliales qui, à l'état normal, ne réagissent pas avec les facteurs sanguins capables de déclencher la formation d'un thrombus. Lors d'une blessure, le sous-endothélium est mis à nu, les plaquettes réagissent avec les structures sous-endothéliales et particulièrement aux fibrilles de collagène grâce à des récepteurs glycoprotéiniques présents à la surface plaquettaire et une protéine circulante de masse moléculaire élevée, le facteur de Von Willebrand, glycoprotéine synthétisée par la cellule endothéliale et le mégacaryocyte. On observe un changement conformationnel du facteur Willebrand (nécessaire à l'interaction avec GPIb plaquettaire). Le facteur de Von Willebrand établit un pont entre d'une part les structures sous endothéliales, notamment les microfibrilles d'autre part les glycoprotéines de la membrane plaquettaire la GPIb. Cette dernière est combinée aux glycoprotéines GPIX et GPV

constituant le complexe Ib-IX-V permettant ainsi l'adhésion des plaquettes (RUGGERI, 1994 ; COLLIER, 1995 ; BERNDT et al., 1995 ; ANDREWS et al., 1997 ; ZITOUN et al., 1998 ; SAVAGE et al., 1998) (figure 1.2). D'autres mécanismes d'adhésion à certains types de collagène impliquent principalement d'autres récepteurs glycoprotéiques comme la GPIc/GPIIa et plus accessoirement la GPIV, adhésion à la fibronectine impliquant GPIa/GPIIa. La GPIb stimulée par le facteur de Von Willebrand transmet des signaux activateurs à l'intérieur de la plaquette : l'adhésion qui s'amorce excite les récepteurs de la plaquette qui, activée, développe des pseudopodes, s'étale de plus sur le collagène, et ce faisant forme des ponts beaucoup plus nombreux avec le collagène par l'entremise de la GPIb et du facteur de Von Willebrand. Grâce à l'étalement le collagène excite un nombre croissant de récepteurs plaquettaires ; l'activation externe est transmise par la plaquette par des médiateurs biochimiques qui concrétisent et amplifient l'activation des plaquettes. L'adhésion est suivie d'une activation des plaquettes. Cette activation présente deux aspects fondamentaux : un changement de forme, un changement de la structure interne des plaquettes et une activation métabolique (JOBIN, 1995).

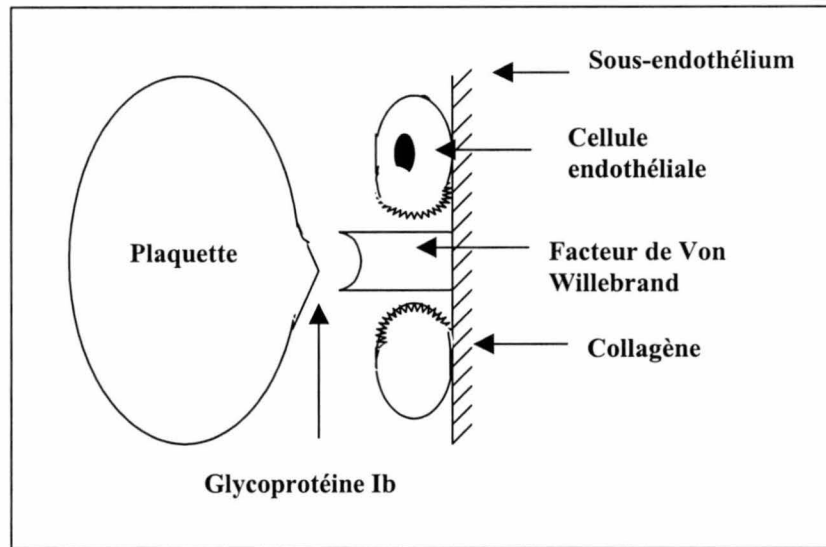


Figure 1. 2 : Adhésion plaquettaire au sous-endothélium

(Source : Zitoun R, Samama MM, Marie JP. Manuel d'hématologie, 5^{ème} édition, 1998).

1. 2. 2. 3 Activation des plaquettes

Différents inducteurs pharmacologiques exogènes et endogènes (collagène, ADP, adrénaline, acide arachidonique, thrombine) sont capables de déclencher l'activation et l'agrégation plaquettaire après s'être fixés sur un récepteur membranaire spécifique. L'activation plaquettaire comprend de multiples réactions morphologiques et biochimiques, séquentielles ou simultanées, qui sont mise en branle par l'action d'agonistes primaires (collagène, thrombine) sur les récepteurs membranaires des plaquettes. L'activation plaquettaire peut s'accompagner de l'apparition de traces de

thrombine à la suite de la libération du facteur tissulaire ou thromboplastine cellulaire, présente à la surface de la cellule endothéliale et activation de la voie exogène de la coagulation. La thrombine se fixe sur des récepteurs de la membrane plaquettaire, et elle est capable d'activer une phospholipase A2 produisant ainsi de l'acide arachidonique des phospholipides membranaires qui sous l'action de la cyclo-oxygénase et d'une thromboxane-synthétase mène à la formation de thromboxane A2, agent agrégant (figure 1. 3). Ces agonistes primaires excitent un récepteur membranaire et activent la phospholipase C. Celle-ci transforme le phosphatidylinositol en deux messagers très actifs : l'inositol triphosphate et le diacylglycérol. Ces trois messagers biochimiques (thromboxane A2, l'inositol triphosphate, le diacylglycérol) provoquent une forte augmentation de la concentration des ions calciques dans le cytosol des plaquettes qui constitue un messager intracellulaire. Le calcium qui s'y accumule provient soit du système tubulaire dense soit du milieu extracellulaire. Tous les activateurs physiologiques augmentent le calcium et à son tour, cette hausse déclenche ou accélère l'ensemble des réactions propres à la séquence activation, sécrétion et agrégation plaquettaires (JOBIN, 1995). Le thromboxane A2 et le PAF provoquent l'amplification externe de l'activation plaquettaire ; devenus des messagers extracellulaires, ils recrutent d'autres plaquettes et déclenchent la sécrétion et l'agrégation plaquettaire. Les leucocytes activés synthétisent et sécrètent aussi le PAF qui est un puissant médiateur de l'inflammation et possèdent aussi la propriété d'activer les plaquettes. Il provoque le changement de forme et cause la sécrétion et l'agrégation plaquettaire (JOBIN, 1995).

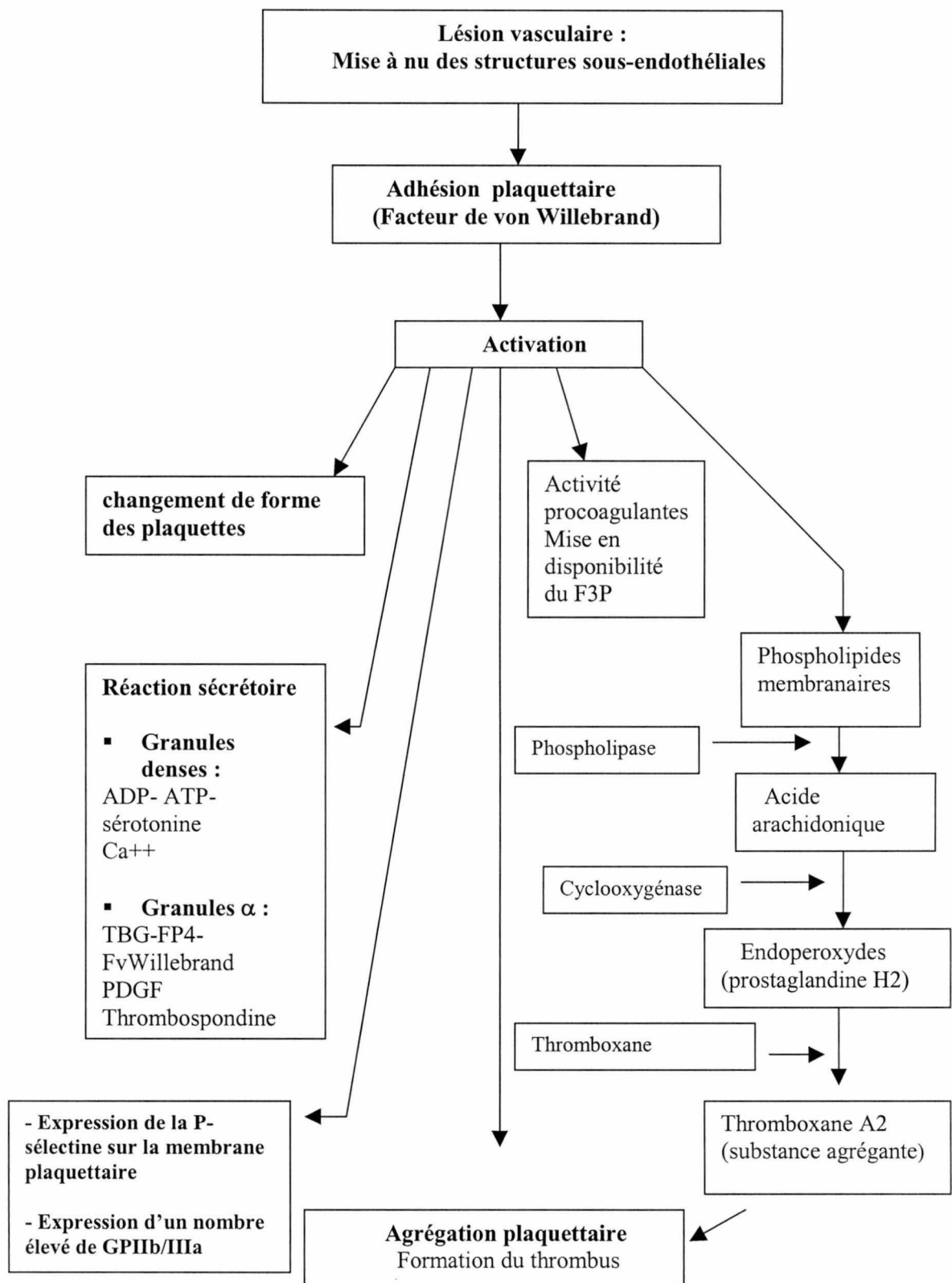


Figure 1. 3 : Schéma simplifié du métabolisme des prostaglandines et de la formation du thrombus plaquettaire au cours de l'hémostase primaire.

L'activation plaquettaire s'accompagne de la dissociation et de la réassociation des microtubules en anneaux plus étroits au centre de la cellule. Les plaquettes deviennent sphériques et plus volumineuses, puis l'anneau de microtubules périphériques se rompt, alors elles s'étalent et émettent des pseudopodes (Figure 1. 4).

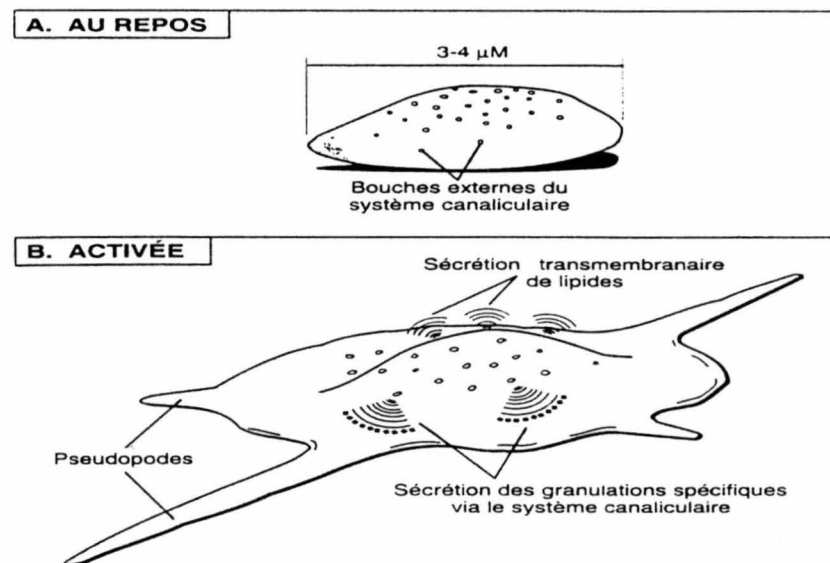


Figure 1. 4 : Vue extérieure d'une plaquettes sanguine au repos et activée après adhésion.

(Source : L'hémostase de Jobin François, 1^{ère} édition, 1995)

On observe la centralisation des granules (denses et alpha) qui vont se retrouver au contact des invaginations de la membrane plaquettaire (système canaliculaire ouvert). La fusion de ces granules avec la membrane de ces invaginations entraîne la libération dans le plasma du contenu des granules, le tout accompagné de l'expression à la surface de la plaquette activée d'un certain nombre de protéines qui sont présentes au niveau de la membrane des granules alpha, en particulier la P-sélectine (GMP140 ou CD62P) ainsi qu'une importante augmentation des molécules de GPIIb/IIIa. Celles-ci subissent une modification de leur configuration spatiale et peuvent alors fixer des molécules de fibrinogène, du calcium, et induire l'agrégation des plaquettes (BAUMGARTNER et MUGGLI, 1976 ; LOZANO et al., 1996).

1. 2. 2. 4 Sécrétion plaquettaire

Liée à l'activation plaquettaire, la sécrétion concerne deux types de granulations : Les granules denses contiennent de l'ADP, de l'ATP, de la sérotonine, des ions Ca^{++} . L'ADP renforce l'agrégation et la sérotonine provoque une vasoconstriction qui participe à l'hémostase. Les granules alpha contiennent des protéines, certaines participent particulièrement à l'hémostase primaire comme le fibrinogène, le facteur de Von Willebrand, la thrombospondine; d'autres à la coagulation comme le facteur V et la protéine S. L'activation des plaquettes par la thrombine, le collagène ou des doses fortes d'ADP entraîne un phénomène d'autoactivation lié, d'une part à la sécrétion

d'ADP des granules denses, d'autre part à la synthèse de thromboxane A₂ à partir des phospholipides (ZITOUN et al., 1998).

1. 2. 2. 5 Agrégation des plaquettes

Les plaquettes activées expriment à leur surface les glycoprotéines GPIIb et GPIIIa qui deviennent actives après des changements de conformation. En effet, quelques 50 000 nouveaux récepteurs se forment sur la membrane de chaque plaquette par la réunion et l'activation des glycoprotéines GPIIb et GPIIIa. On a estimé que ces complexes GPIIb/IIIa occupent 50% de la surface plaquettaire (JOBIN, 1995). Le complexe IIb/IIIa stabilisé par des ions Ca⁺⁺ fait partie d'une famille de protéines d'adhésion que l'on appelle des intégrines ; elles se lient à des séquences d'acides aminés particulières dites RGD (Arginine-Glycine-Asparagine) que l'on trouve dans des protéines comme le fibrinogène, les fibronectines ou le facteur de Von Willebrand. Le fibrinogène se lie à son récepteur plaquettaire, le complexe GPIIb/IIIa et établit des ponts entre les plaquettes, permettant ainsi l'agrégation et la formation du thrombus plaquettaire responsable de l'occlusion artérielle localisée. La thrombospondine (une protéine d'origine intraplaquettaire) renforce les liaisons dues au fibrinogène. Le facteur de Von Willebrand jouerait aussi un rôle dans l'agrégation en établissant des ponts entre les GPIIb/IIIa des plaquettes voisines activées (PHILLIPS et al., 1988 ; PLOW et GINSBURG, 1989 ; ZITOUN et al., 1998 ; TOPOL et al., 1999) (figure 1. 5).

Les substances libérées au cours de la réaction sécrétoire, comme le thromboxane A₂, amplifient le phénomène d'agrégation des plaquettes en favorisant le recrutement de nouvelles plaquettes, et les agrègent les unes aux autres.

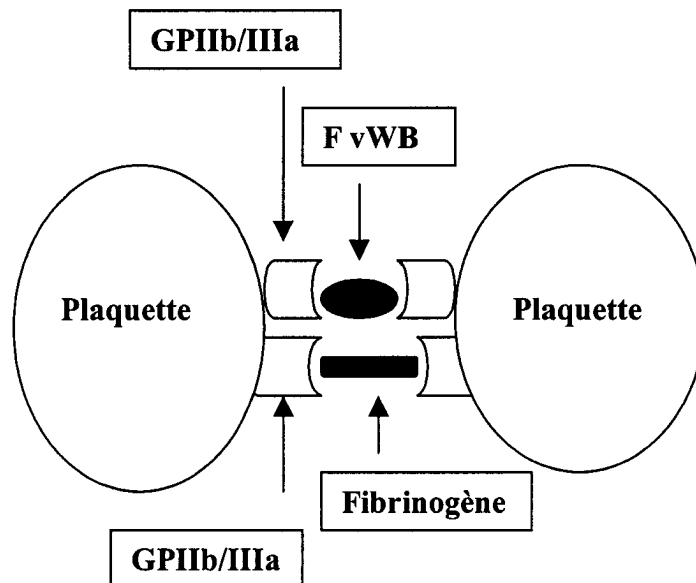


Figure 1. 5 : Rôle du fibrinogène et du facteur de von Willebrand dans l'agrégation plaquettaire

Les plaquettes sont des cellules anuclées, incapables de synthétiser des protéines, et peu de chercheurs ont accordé un rôle régulateur à ces fragments de cellules, notamment comme source des médiateurs inflammatoires au même titre que les autres cellules nucléées. Les plaquettes peuvent adhérer à l'endothélium dysfonctionnel, au

collagène exposé, et aux macrophages. Elles sont alors activées, elles libèrent le contenu de leurs granules, qui contiennent des cytokines et des facteurs de croissance qui, ainsi que la thrombine, peuvent contribuer à la migration et à la prolifération des CML et des monocytes (BOMBELI et al., 1998). Les phospholipides membranaires des plaquettes activées mènent à la formation de l'acide arachidonique libre, qui peut être transformé en prostaglandines telles que le thromboxane A₂, ou les leucotriènes. Ces derniers, peuvent amplifier la réponse inflammatoire (DAVIES, 1990 ; ROSS, 1993 ; FALK et al., 1996). Des données récentes suggèrent que les patients avec SCA ont non seulement des interactions élevées entre les plaquettes (agrégats homotypiques), mais aussi entre les plaquettes et les leucocytes (agrégats hétérotypiques) décelables dans le sang. Ces agrégats se forment suite à l'activation des plaquettes et leur dégranulation, par la suite celles-ci adhèrent aux leucocytes périphériques. Les premiers travaux ont suggéré que ces agrégats hétérotypiques se forment au cours de l'inflammation (ARBER et al., 1991). Les plaquettes se lient au récepteur de leucocyte, par l'intermédiaire de P-sélectine (CD62P) exprimé sur la surface des plaquettes activées (RINDER et al., 1991).

Pour comprendre le rôle des plaquettes dans la formation des plaques d'athérome, Huo et collaborateurs ont utilisé un modèle de souris transgéniques qui présentent des anomalies pour un gène de régulation du métabolisme du cholestérol. Ces souris ayant perdu ce gène ne sont plus capables d'assurer correctement la dégradation du cholestérol et développent des plaques d'athérome semblables à celles observées chez

l'homme. L'étude de ces souris a permis de montrer que les plaquettes sanguines activées jouent un rôle majeur dans la formation de l'épaississement des artères. Par l'intermédiaire d'une molécule située à la surface des plaquettes, la P-sélectine, ces dernières vont former des agrégats avec les monocytes et les leucocytes. Ces agrégats vont venir s'attacher au niveau de la plaque d'athérome et entraîner l'aggravation des lésions en libérant des molécules inflammatoires. Ces résultats obtenus grâce à ce nouveau modèle de souris transgéniques montrent donc le rôle important des plaquettes sanguines dans le développement de l'athérosclérose (HUO et al., 2003). Les liens étroits entre la thrombose et l'inflammation ont suscité l'intérêt d'explorer la PCR dans cette étude.

1. 2. 3 Manifestations cliniques de la thrombose coronarienne

Dans les conditions normales, aussi bien au repos qu'à l'effort, il existe au niveau du cœur un équilibre entre les besoins et les apports en oxygène au myocarde, qui dépendent du flux sanguin coronaire. Cet équilibre peut-être rompu par la formation de la plaque d'athérome à l'intérieur d'une ou des artères coronaires, et dont l'apparition est favorisée par un certain nombre de facteurs de risque : tabac, diabète, hypertension artérielle, excès de cholestérol exogène, dyslipidémie, obésité et sédentarité. La présence de la plaque d'athérome à l'intérieur du vaisseau sanguin est responsable de la sténose coronarienne. Certaines conditions physiopathologiques

peuvent aussi favoriser la survenue d'un accident aigu : l'activité sympathique et le taux de catécholamines circulantes augmentent avec le stress, l'activité physique ou la consommation. Il en résulte une élévation de la pression artérielle, de la fréquence cardiaque et du tonus artériel, donc des contraintes appliquées sur la plaque d'athérome (QUILICI et GALLO, 1999). Le ou les éléments déclencheurs d'un événement aigu se traduisant par la rupture, l'ulcération et l'hémorragie au niveau de la plaque induisant une thrombose totale ou subtotale menant à l'événement clinique sont encore plus ou moins bien définis. On sait que les facteurs de risque qui conditionne la dysfonction endothéliale peuvent induire l'inflammation, la croissance de la plaque et l'évolution vers son instabilité ; le contrôle de ces facteurs de risque et l'amélioration de la fonction endothéliale stabilise la plaque d'athérome.

Par conséquent, le cœur souffre d'une diminution d'apport sanguin, donc d'oxygène aux cellules du myocarde, appelée aussi insuffisance coronarienne. La rupture ou l'érosion de la plaque d'athérome provoque l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire aboutissent à la formation d'un thrombus principalement riche en plaquettes dont la présence induit une obstruction de l'artère coronarienne, avec une diminution importante des apports en oxygène au myocarde. Ce manque d'oxygène entraîne une souffrance du territoire cardiaque concerné ou ischémie myocardique, survenant initialement lorsque les besoins en oxygène augmentent, notamment au cours de l'effort ou de la digestion et se manifeste par le signe clinique fonctionnel, la douleur thoracique. L'obstruction incomplète des coronaires se manifeste

cliniquement par les SCA sans élévation du segment ST soit l'AI ou l'IM non Q; si par contre l'obstruction est complète, l'ischémie myocardique évolue vers la nécrose des cellules cardiaques concernées se traduisant cliniquement par les SCA avec élévation du segment ST soit l'IM avec onde Q. La présence de collatérales ainsi que l'occlusion ou la subocclusion transitoire ou soutenue sont d'autres facteurs qui conditionnent l'évolution vers l'AI versus IM sans onde Q ou IM avec onde Q.

Différents facteurs peuvent favoriser la thrombose à partir d'une plaque fracturée : des facteurs extrinsèques à la plaque (essentiellement des anomalies plaquettaires ou des systèmes de la coagulation, la plupart de ces facteurs étant d'origine génétique), mais aussi des facteurs intrinsèques (libération par la plaque de facteurs procoagulants comme les acides gras ou les facteurs tissulaires). Le noyau riche en lipide exposé à la suite de la rupture de plaque, est hautement thrombogène et possède une concentration de facteur tissulaire plus importante que les autres composants de la plaque (TOSCHI et al., 1997). Suite à l'ulcération d'une plaque d'athérome, les macrophages et l'endothélium ainsi stimulés ont la capacité de sécréter le facteur tissulaire, déclencheur clé de la coagulation plasmatique et générateur de thrombine à l'origine du thrombus (LIBBY et al., 2002). Il existe une très nette corrélation entre l'activité du facteur tissulaire et la présence de macrophages (MORENO et al., 1994). Les facteurs impliqués dans l'hypercoagulabilité systémique peuvent également jouer un rôle ;

l'hypercholestérolémie, le fibrinogène, la fibrinolyse défectueuse peuvent tous contribuer à la formation d'un thrombus. Les épisodes transitoires d'occlusion ou d'infra-occlusion du vaisseau thrombotique et les symptômes ou altération de l'électrocardiogramme transitoires dont ceux-ci s'accompagnent peuvent s'expliquer par une thrombolyse spontanée. Le thrombus est principalement riche en plaquettes. Il a la capacité de libérer des substances vasoconstrictives telles que la sérotonine et le thromboxane A2 qui induisent une vasoconstriction au site de rupture de plaque ou dans la micro-circulation, venant ainsi aggraver le problème d'apport circulatoire est favorisées le passage de la phase stable à la phase instable de l'angine (WILLERSON et al., 1989). La thrombose au site de rupture de la plaque peut se fragmenter en petites particules, qui migrent vers l'aval et peuvent occlure les artérioles et les capillaires. Ces embols plaquettaires peuvent entraîner de petites zones de nécrose (lésion myocardique minimale, petits infarctus) (Falk et al., 1995).

1. 2. 4. Évolution du processus thrombotique

1. 2. 4. 1 Evolution locale

L'importance du processus thrombotique et ses conséquences vont être très variables. Les SCA sans sus-décalage du segment ST traduisent habituellement l'existence d'un rétrécissement coronaire serré mais non occlusif. On parlera d'infarctus sans onde Q (encore appelé infarctus incomplet ou sous-endocardique) s'il existe une élévation des marqueurs de la nécrose. Dans le cas contraire, on parlera d'AI. L'étendue de la nécrose est en règle limitée (3 à 4 fois moins importante que dans l'infarctus avec onde Q). Son mécanisme est multiple : soit occlusion coronaire certes transitoire mais suffisamment répétée pour avoir entraîné la mort cellulaire, soit embols plaquettaires à partir de la plaque instable et qui vont obstruer des artérioles terminales intramyocardiques (Falk et al., 1995). Bien que la nécrose soit limitée, il est démontré que l'élévation des marqueurs biologiques a une valeur pronostique défavorable (LINDAHL et al., 1997).

L'infarctus sans onde Q s'accompagne volontiers de récives ischémiques dans les jours et semaines qui suivent l'épisode initial, pouvant évoluer vers l'infarctus avec onde Q qui augmente nettement la morbi-mortalité par rapport à l'AI sans élévation des marqueurs. Cette morbi-mortalité est corrélée au taux d'élévation de la Troponine (ANTMAN et al., 1996). Le sus-décalage du segment ST (lésion sous-épicaire)

traduit une souffrance ischémique de toute l'épaisseur du myocarde (ischémie transmurale) en rapport avec l'occlusion complète d'une artère coronaire. Si l'occlusion se prolonge, l'ischémie conduit à la nécrose qui progresse de l'endocarde vers l'épicarde, et du centre vers la périphérie, et qui est d'autant plus importante que le siège de la lésion est proximal. Mais l'élément majeur est la durée de l'occlusion coronaire, la nécrose étant quasi complète à la 6ème heure (Guidelines, 2000). Le thrombus occlusif se développe plus ou moins rapidement ; la symptomatologie (IM, accident vasculaire cérébral, ischémie périphérique) peut apparaître brutalement ou fait suite à des manifestations cliniques évoquant d'abord une thrombose non occlusive (comme par exemple dans le cas d'un IM survenant quelques jours après l'apparition de symptômes d'AI). L'évolution naturelle de l'accident athérothrombotique peut se faire vers la disparition progressive du thrombus (thrombolyse physiologique). Toutefois, dans un certain nombre de cas, une partie significative du thrombus sera incorporée dans la paroi et contribuera ainsi à la croissance de la plaque. Le thrombus peut rester limité et s'incorporer secondairement à la plaque, avec reconstitution d'une chape fibreuse, et participer ainsi à la progression brutale de la lésion athéroscléreuse (TOPOL et YADAV, 2000 ; BERTRAND et al., 2002). En cas de thrombus occlusif la persistance d'une occlusion totale à long terme est possible. Ces occlusions chroniques sont souvent à la base du développement de circulations collatérales de suppléance. Il est aussi possible d'observer une recanalisation partielle tardive (plusieurs mois après l'accident initial) par des néovaisseaux.

1. 2. 4. 2 Evolution à distance

La formation d'un thrombus au site d'une érosion ou d'une rupture de plaque expose fort logiquement à un risque d'embolies dans le territoire d'aval. Ces embolies sont reconnues depuis longtemps comme faisant partie de la physiopathologie des accidents vasculaires cérébraux d'origine ischémique ; de même, la survenue d'embolies distales fait partie des tableaux cliniques possibles lorsque les lésions d'athérosclérose touchent les artères des membres inférieurs. Par contre, jusqu'à ces dernières années, la possibilité d'embolies lors d'un accident coronarien aigu avait été fort peu évoquée. L'utilisation systématique de dosages enzymatiques très sensibles et spécifiques (troponines) a pourtant permis de démontrer l'existence de nécroses myocardiques a minima (a priori d'origine embolique) dans une proportion importante des cas d'AI. La prise de conscience de la grande fréquence de ces accidents emboliques est importante car leur mise en évidence a un impact sur le pronostic et modifie les schémas thérapeutiques. Le thrombus au site de rupture de plaque peut se fragmenter en petites particules, qui migrent vers l'aval et peuvent occlure les artérioles et les capillaires, ces embols plaquettaires peuvent entraîner de petites zones de nécrose (lésion myocardique minimale, petits infarctus) en l'absence d'occlusion de la coronaire épicaudique, diagnostiqués par la mesure de marqueurs biologiques les plus sensibles de l'infarctus (TnT ou TnI) (TOPOL et YADAV, 2000 ; BERTRAND et al., 2002).

L'électrocardiogramme au repos constitue l'examen clé de l'évaluation des patients suspects de SCA. C'est un précieux outil de dépistage chez les patients présentant un tableau atypique et il permet les diagnostics alternatifs tels que la péricardite, l'embolie pulmonaire ou la myocardiopathie. Dans plusieurs études, on s'est en fin de compte aperçu que 18% des électrocardiogrammes sont atypiques et 50% ne permettent pas de faire le diagnostic (The Task Force on management of acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology, 1996), (FISCH, 1997). c'est là que les marqueurs biologiques trouvent leurs intérêts (GOLDBERG et al., 1998). Initialement limitée aux dosages de l'activité de certaines enzymes non spécifiques du muscle myocardique, le diagnostic biochimique de l'IM s'est trouvé améliorer par le développement de nouveaux marqueurs de plus en plus sensibles et de plus en plus spécifiques impliqués dans des fonctions métaboliques ou structurelles du myocyte. Les troponines et les CK-MB sont dosés en routine (BERTRAND et al., 2000) et ont une valeur pronostique (ASSEMAN et al., 1999) dans les SCA sans élévation du segment ST. Ils contribuent largement à leur stratification (HAMM et BRAUNWALD 2000) et leur orientation thérapeutiques (HEESCHEN et al., 1999).

1. 3 Marqueur de l'athérombose

1. 3. 1 Marqueur de l'inflammation

Le rôle de l'inflammation dans la maladie cardiovasculaire et particulièrement dans la thrombogénèse est devenu de plus en plus reconnu comme composant important du processus global de la maladie (SHEBUSI et KILGORE, 2002). Comme nous l'avons décrit précédemment, l'inflammation est une caractéristique importante des lésions athéroscléreuses (ROSS, 1999) et omniprésente au cours des SCA.

La PCR est une protéine de la phase aiguë de l'inflammation, en raison de l'élévation prononcée de sa concentration après des dommages ou l'inflammation de tissu. Ce marqueur diagnostique sensible mais non spécifique à l'inflammation est produit principalement par le foie en réponse à certains stimuli inflammatoires tels que l'interleukine-6, médiateur chimique sécrété par les macrophages et certains lymphocytes (KUTA et BAUM, 1986 ; MONSUEZ, 2002). La PCR est ainsi nommée, car elle précipite en présence d'un polysaccharide C du pneumocoque. La PCR augmente rapidement, douze à vingt quatre heures, après le début du processus inflammatoire. Les taux peuvent atteindre mille fois la valeur basale, mais les valeurs normales de la PCR ne sont pas bien définies. Des taux circulants élevés de PCR sont prédicteurs d'événements coronariens chez les patients ayant un angor stable ou instable. Quel que soit le mécanisme sous-jacent, la mesure de la PCR comme

marqueur pronostic pourrait être utile dans la prise en charge de la maladie coronarienne (LIBBY, 1995 ; RIDKER et al., 1997 ; HAVERKATE et al., 1997; RIDKER et al., 2000). Des données disponibles montrent que les sujets atteints de SCA avec des valeurs de PCR supérieures à 0,3 mg/dl sont considérés à risque élevé de d'IM durant les trois mois du suivi (BIASUCCI et al., 1999), de resténose tardive (BUFFON et al., 1999) et l'élévation de son taux dans les six premières heures après un IM est prédictive des événements coronariens après angioplastie primaire avec endoprothèse (TOMODA et AOKI, 2000). Pour d'autres auteurs, la persistance de l'élévation de PCR (>0,5 mg/dl à 72 heures) après ICP, chez les patients avec angine stable est liée à un risque de survie diminuée durant une année (GASPARDONE et al., 1998). D'autres études ont reporté un taux de resténose plus élevée si la PCR demeurée élevée quatre vingt seize heures près revascularisation (GOTTSAUNER-WOLF et al., 2000). L'étude d'Azar et collaborateurs a montré que l'ICP déclenche une réponse inflammatoire systémique caractérisée par une augmentation significative de la PCR; elle peut donc offrir une information pronostique après ICP élective et identifier un sous-groupe de patients avec un risque de resténose élevé (AZAR et al., 1997). Cependant, l'absence de valeur seuil de la PCR, dans un contexte pathologique clinique limite son utilisation en routine. Dans notre étude, la relation entre la PCR et l'indice de l'activation plaquettaire, MPC a été étudié.

1. 3. 2 Marqueur de l'activation plaquettaire

1. 3. 2. 1 Expression de la P-sélectine (CD62P)

La P-sélectine est une glycoprotéine initialement localisée dans les membranes des granules sécrétoires des plaquettes au repos, ce qui lui valut, peu après sa découverte en 1989, l'appellation de GMP-140 (Granule Membrane Protein 140), PADGEM ou CD62P. Cette molécule d'adhésion est un membre de la famille des sélectines qui comprend aussi la sélectine E (ELAM-1) et la sélectine L (LECAM-1) (Mc GREGOR, 1995). Elles sont responsables des interactions adhésives entre les leucocytes et l'endothélium vasculaire ainsi qu'entre les leucocytes et les plaquettes (ZIMMERMAN et al., 1992 ; Mc EVER, 1992 ; LASKY, 1992). En effet, de nombreux résultats indiquent que la P-sélectine est impliquée dans l'interactions des plaquettes activées à d'autres cellules telles que les monocytes et les neutrophiles chez les patients coronariens (PALABRICA et al., 1992 ; MICKELSON et al., 1996, FURMAN et al., 1998). La fixation des leucocytes par la P-sélectine aux cellules endothéliales vasculaires semble jouer un rôle vital dans l'extravasation des leucocytes vers des sites inflammatoires. De plus, la P-sélectine exprimée par les plaquettes ou cellules endothéliales pourrait stimuler les leucocytes, provoquant l'expression par ces cellules du facteur tissulaire qui est aussi un inducteur de l'activation des plaquettes (Mc GREGOR, 1995 ; MYERS et al., 2002).

L'étude de Gawaz et collaborateurs a montré une augmentation de l'expression de la P-sélectine sur les plaquettes et d'autres composants granulaires qui pourraient déclencher les mécanismes biochimiques impliqués dans la resténose, chez les patients souffrant de SCA traités avec angioplastie ou thrombolyse (NURDEN et al., 1994 ; GAWAZ et al., 1996).

L'étude de Tschoepe et collaborateurs a fourni l'évidence qu'un nombre élevé de plaquettes activées exprimant la P-sélectine ou CD62P sur la surface membranaire des plaquettes, reflète bien l'activation in vivo des plaquettes (TSCHOEPE et al., 1993 ; TSCHOEPE et al., 1991 ; JOHNSTON et al., 1989 ; STENBERG et al., 1985 ; NIEUWENHUIS et al., 1987) et qu'il est associé aux événements ischémiques précoces survenant après l'ICP (DE FEYTER et al., 1991 ; SPIELBERG et al., 1990 ; DETRE et al., 1990).

Cependant, Michelson et collaborateurs, ont montré que dans la circulation, les plaquettes peuvent perdre rapidement leur P-sélectine de surface après la dégranulation et elles continuent pourtant à circuler et fonctionner (MICHELSON et al. 1996 ; BERGER et al., 1998). L'expression de la P-sélectine est considérée comme le marqueur de référence de l'activation des plaquettes (MICHELSON et al., 1996 ; MICHELSON et FURMAN, 1999 ; COULTER et al., 2000), elle permet la détection directe des plaquettes activées (ABRAMS et SHATTIL, 1991). Pour cela, dans cette étude, l'expression de la P-sélectine mesurée par la cytométrie par immunofluorescence est comparée avec la mesure de la densité des plaquettes, qui

représente probablement un indice de l'activation des plaquettes, mesuré par le système automatisé, l'ADVIA 120.

1. 3. 2. 2 Mesure de la densité des plaquettes

À l'état physiologique, les plaquettes sanguines sont inactives et ont une forme discoïdale. Lorsqu'elle s'activent les plaquettes changent de forme, deviennent sphériques, augmentent de volume et libèrent le contenu de leurs granules autant denses qu'alpha, incluant des inducteurs de l'activation tel que l'ADP. La libération du contenu d'une plaquette se traduit par une baisse de sa concentration cellulaire. La mesure de la concentration intracellulaire du contenu des plaquettes peut donc refléter les changements liés à l'activation plaquettaire et peut être utilisée dans l'évaluation de l'activation des plaquettes comme outil clinique courant.

L'ADVIA 120 est un système automatisé qui identifie les plaquettes individuellement selon leur taille et leur indice de réfraction par une méthode bidimensionnelle de dispersion de la lumière de laser (light scattering) basée sur la technique de cytométrie de flux. L'indice de réfraction, un indicateur de densité de plaquette, est converti en concentration moyenne de contenu des plaquettes ou Mean platelet component (MPC en g/dl) (CHAPMAN et al., 2003).

Des études préliminaires ont mis l'accent sur ce nouveau paramètre plaquettaire, le MPC, mesuré par un système hématologique, l'ADVIA 120 et ont montré que la

densité cellulaire des plaquettes activées est reflétée par des valeurs diminuées du MPC et corrèle *in vitro* avec l'expression de la P-sélectine. La chute du MPC représente indirectement un indice de dégranulation et d'activation des plaquettes et pourrait être utilisé en routine pour évaluer certains désordres plaquettaires (MACEY et al., 1999 ; CHAPMAN et al., 2003 ; AHNADI et al., 2003). L'activation plaquettaire est impliquée dans de nombreux désordres cliniques et la surveillance de l'état d'activation plaquettaire est justifiée (SCHROR, 1995 ; ANDREWS et al., 1997). La recherche de littérature a révélé que cette étude est la première qui se propose de valider le MPC comme indicateur de l'activation plaquettaire, chez des patients coronariens soumis à l'angioplastie et sous antiplaquettaires.

1. 3. 3 Les marqueurs biochimiques des dommages myocardiques

Le myocarde libère, dès le début de l'IM, des protéines présentes dans le myocyte qui serviront de marqueurs diagnostiques. Il s'agit d'une conséquence de la destruction des structures intracellulaires et de la membrane cellulaire qui marque l'ischémie irréversible. Leur délai d'apparition dans le sérum dépend de leur taille et de leur solubilité.

1. 3. 3. 1 Myoglobine

La myoglobine (MGB) est une protéine de faible PM, présente dans toutes les cellules du muscle strié. En raison de son faible poids moléculaire, la MGB est libérée précocement de façon significative à partir de la zone nécrosée ; elle s'élève très rapidement dès la troisième heure en cas d'ischémie (LOUVARD et al., 1985 ; JENNINGS et al., 1990 ; BRAUNWALD et al., 1992 ; CHAPELLE, 1993 ; MAIR et al., 1995). Quant à sa cardiospécificité, elle est loin d'être exclusive. En effet, elle augmente certes au cours des nécroses myocardiques, mais également dans les situations suivantes : insuffisance rénale après chirurgie cardiaque, lésions du muscle squelettique, rhabdomyolyses, exercices physiques intenses, insuffisance rénale terminale (diminution de la filtration glomérulaire), et certaines intoxications (BEN AMOR et al., 1993 ; CHAPELLE, 1993 ; PHILIPPON, 1997).

1. 3. 3. 2 Créatines kinases et ses isoenzymes

La créatine kinase (CK) est présente dans le cytoplasme des cellules musculaires striées incluant le myocarde. Elle est composée de deux chaînes M et B formant les isoformes MM, MB, et BB, M (muscle), B (Brain = cerveau). La fraction MB prédomine dans le tissu cardiaque, mais ne lui est pas spécifique. Au cours de l'IM, elle augmente transitoirement dans le plasma et l'urine, mais elle n'augmente pas dans

l'AI (DELANGHE et al., 1995). L'ischémie myocardique réversible n'est pas associée à une élévation de la CK plasmatique (ISHIKAWA et al., 1997). En outre, on observe des variations de la CK-MB dans les situations suivantes : crise épileptique, hypothyroïdie, hyperthermie maligne, maladie de Duchenne, delirium tremens, syndromes parkinsoniens, traumatismes, brûlures, injections musculaires, péricardite, tachycardie prolongée, contusions musculaires et cardiaques, chirurgie et insuffisance vasculaire (REVENKO, 1993 ; ARTHAUD, 1997; ST LOUIS et GANDHI, 1994). La définition du SCA comprend les entités cliniques, AI et IM. Ces deux derniers concepts ont vu leur signification évoluer au cours des dernières années, dans la mesure où, d'après la nouvelle définition des sociétés américaines et européennes de cardiologies, un IM est défini comme la preuve d'un mouvement typique de marqueurs spécifiques de nécroses du myocarde en présence d'une ischémie prolongée ou lors d'une intervention coronarienne (Myocardial infarction redefined – A consensus document of The Joint European Society of Cardiology/ American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction, 2000). L'ancienne «AI, troponine positive» est donc aujourd'hui aussi considérée comme un IM (beaucoup de cliniques emploient cependant le terme de «micro-infarctus» pour les formes de SCA sans élévation de la CK pour la distinguer de l'IM classique).

1. 3. 3. 3 Troponines I et T

Le complexe troponine assure la régulation de la contraction du muscle strié en contrôlant l'interaction actine-myosine. Il est constitué de trois sous-unités : la troponine C qui fixe le calcium et qui n'a aucune spécificité cardiaque, la troponine I (cTnI) qui inhibe l'interaction actine-myosine (contraction) en l'absence de calcium, la troponine T (cTnT) qui lie le complexe troponine à la tropomyosine. L'augmentation significative des troponines (TnT et TnI) et de leurs isoformes cardiaques (cTnI et cTnT) est précoce, survenant en moyenne trois à six heures après les premiers symptômes de l'IM (APPLE, 1996). La normalisation survient habituellement entre une et deux semaines (MAIR et al., 1991), cette dernière propriété peut être utilisée pour un diagnostic rétrospectif de l'IM (LAPERCHE, 1997). La sensibilité augmente rapidement pour atteindre des valeurs de plus en plus proches de 100%. Cette sensibilité reste maximale durant les premiers jours qui suivent l'IM, la normalisation de la troponine étant lente et progressive (BODOR, 1994). La TnI et la TnT représentent les marqueurs préférés de la nécrose myocardique, car à la fois plus spécifiques et plus fiables que les enzymes cardiaques classiques telles la CK ou son isoenzyme MB (CK-MB) dans ce contexte. En effet, Les patients présentant les SCA avec des CK, CK-MB normales et une TnI élevée ont un plus mauvais pronostic que ceux avec un TnI normale. (ANTMAN et al., 1996 ; LUSCHER et al., 1997). On pense que toute élévation de la TnT ou I cardiaque reflète une nécrose cellulaire

myocardique irréversible. Dans un contexte d'ischémie myocardique (douleurs thoraciques, modifications du segment ST), il y a lieu de le cataloguer comme un IM selon le récent document de consensus de la société européenne de cardiologie et de l'American college of cardiology. (Myocardial infarction redefined. A consensus document of the joint European society of cardiology/American college of cardiology committee for the redefinition of myocardial infarction, 2000). La TnI et la TnT ont une cardiospécificité sans doute meilleure que celle des autres marqueurs de l'IM. En effet, la cTnI est relativement indétectable dans l'insuffisance rénale notamment au cours de l'hémodialyse, les atteintes musculaires, l'exercice physique intense et la rhabdomyolyse. La nécrose myocardique « à minima » peut être détectée par l'élévation isolée de la troponine au cours de l'AI. C'est bien de la synthèse de ces événements cliniques et biologiques que vient la nouvelle définition des SCA (GUIDELINES, 2000). La présence de troponine au dessus du 99^{ème} percentile suggère un SCA, IM avec ou sans onde Q. Les SCA sans sus-décalage du segment ST traduisent habituellement l'existence d'un rétrécissement coronaire serré mais non occlusif. Il n'y a donc pas d'indication à réaliser une désobstruction coronaire en urgence. Les marqueurs biologiques prennent ici une importance diagnostique et pronostique. La troponine joue un rôle pronostic important, elle permet d'identifier les patients à bas risque susceptible de bénéficier d'une prise en charge hospitalière courte voire, ambulatoire. Il s'agit de patients avec une probabilité faible de maladie coronarienne chez lesquels deux dosages négatifs de la troponine à six et douze heures

d'intervalle signent un risque faible d'évènements cardiovasculaires majeurs (décès et infarctus à trente jours) (HAMM et al., 1997). D'autre part, une valeur augmentée de troponine identifie les patients à risque élevé de complications cardio-vasculaires. De plus, ce risque augmente de façon quasi linéaire avec l'élévation de la troponine (ANTMAN et al., 1996). Ceci est la conséquence de nécroses myocardiques focales résultant le plus souvent d'embolisations périphériques de matériel thrombotique d'une plaque instable, observées dans 30% des cas d'AI (DAVIES et al., 1986). On parlera d'infarctus sans onde Q (encore appelé infarctus incomplet ou sous-endocardique) s'il existe une élévation des marqueurs de nécrose. Toutes élévations des troponines est une indication à la stratégie interventionnelle. Le sus-décalage du segment ST (lésion sous-épicaudique) traduit une souffrance ischémique de toute l'épaisseur du myocarde (ischémie transmurale) en rapport avec l'occlusion complète d'une artère coronaire. Si l'occlusion se prolonge, l'ischémie conduit à la nécrose qui progresse de l'endocarde vers l'épicarde, et du centre vers la périphérie, et qui est d'autant plus importante que le siège de la lésion est proximal. Mais l'élément majeur est la durée de l'occlusion coronaire, la nécrose étant quasi complète à la sixième heure (GUIDELINES, 2000).

1. 4 Conduite thérapeutique au cours des SCA

1. 4. 1 Intervention coronarienne percutanée

Il existe plusieurs formes de traitement des SCA, notamment médicamenteux, les changements du style de vie, l'ICP et les pontages coronariens. L'ICP est une thérapie qui consiste à rétablir le flux coronarien en levant l'obstacle créé par la sténose coronarienne par dilatation intravasculaire, maintenue ou non par la pose d'une endoprothèse. Ce dispositif permet de maintenir ouverte l'artère, et donne des résultats cliniques satisfaisants à court et à long terme (SERRUYS et al., 1994 ; FISCHMAN et al., 1994). L'ICP au cours d'un IM est plus efficace que la thrombolyse en reconstituant l'ouverture du vaisseau sanguin et en empêchant la réocclusion (MICHELS et YUSUF, 1995). Cependant, le risque de resténose est élevé (CLOWES et al., 1983 ; SERRUYS et al., 1988 ; FORRESTER et al., 1991) ; elle peut déclencher l'activation des plaquettes et la formation de thrombus (WILENTZ et al., 1987 ; BAUTERS et al., 1996 ; SCHOMIG et al., 1996 ; INOUE et al., 1996 ; KOMATSU et al., 1998). En effet, malgré un traitement à base d'anticoagulants administré au patient avant ICP, la thrombose post-endoprothèse est une complication majeure et se produit dans environ 3% à 21% des cas (HERRMANN et al., 1992 ; HAUDE et al., 1993 ; SERRUYS et al., 1994 ; GAWAZ et al., abstract 1994). Certaines études ont montré que l'augmentation de l'expression des glycoprotéines

membranaires des plaquettes est associée à un plus grand risque de réocclusion après l'ICP (HARKER, 1987 ; LANGFORD et al., 1994).

Tschoepe et collaborateurs, ainsi que d'autres auteurs ont montré une association entre l'activation des plaquettes et les événements ischémiques survenant après l'ICP. L'analyse des marqueurs exposés à la surface membranaire des plaquettes activées (thrombospondine, CD62P et CD63) par cytométrie de flux, fournit des informations prédictives sur l'incidence des complications vasculaires occlusives après l'ICP (TSCHOEPE et al., 1993 ; DETRE et al., 1990 ; DE FEYTER et al., 1991 ; Mc BRIDE et al., 1988).

Certains auteurs ont spéculé que l'AI et l'IM résultaient de l'ischémie myocardique provoquée par la vasoconstriction dynamique de l'artère coronaire et de l'agrégation des plaquettes provoquées par l'accumulation locale de sérotonine et de thromboxane A₂ au site de la sténose coronarienne et des lésions endothéliales (WILLERSON et al., 1989 ; FERNANDEZ-ORTIZ et al., 1994). Cette complication peut être causée par un état thrombotique préexistant ou par l'activation plaquettaire provoquée par l'ICP (HOLLMAN et al., 1983 ; CHESEBRO et al., 1987 ; TCHOEPE et al., 1993). La thrombose est peu commune dans les 24 premières heures après la mise en place de l'endoprothèse (MAK et al., 1996), elle survient surtout les cinquièmes et sixièmes jours après (SCHATZ et al., 1991 ; SCHOMIG et al., 1996). Dans tous les cas, le rôle de l'activation et de l'agrégation des plaquettes est considéré comme important (WILENTZ et al., 1987 ; HARKER, 1987, INOUE et al., 1996). Il

apparaît donc que l'évaluation *in vivo* de l'activation des plaquettes au cours des SCA et de l'ICP présente un grand intérêt (MICHELSON, 1996 ; MICHELSON et FURMAN 1999).

Les antiplaquettaires tel que l'aspirine, le clopidogrel (Plavix®) et l'abciximab (Réopro®), sont indiqués pour prévenir l'activation et l'agrégation des plaquettes (GAWAZ et al., 1996 ; SCHAFER, 1996). Cette thérapie semble donner des résultats à moyen terme de meilleure qualité. D'où l'intérêt de trouver un paramètre efficace qui permet de mesurer directement les variations de l'activation plaquettaire et possiblement évaluer l'efficacité des antiplaquettaires.

1. 4. 2 Mécanismes inhibiteurs des antiplaquettaires

Les antiplaquettaires sont des médicaments capables d'inhiber les fonctions plaquettaires et en particulier l'activation et l'agrégation plaquettaires. Nous savons que de nombreux stimuli sont capables d'activer les plaquettes, et les multiples étapes de la réponse plaquettaire constituent la cible privilégiée des différents antiplaquettaires (figure 1. 6).

Les antiplaquettaires couramment utilisés agissent de façon sélective sur certaines voies d'activation sans aucune action directe sur l'agrégation plaquettaire. Parmi eux, l'aspirine est un antiagrégant plaquettaire qui inhibe la production plaquettaire de thromboxane A₂, puissant inducteur de l'agrégation par l'inhibition irréversible de la cyclooxygénase plaquettaire. Au cours de l'IM et l'AI, l'aspirine réduit la mortalité

d'environ 20% avec une dose minimale de 160 mg, donnée lors de la prise en charge initiale du patient, et l'administration doit être poursuivie à une dose quotidienne comprise entre 75 et 325 mg (ISIS-2 COLLABORATIVE GROUP, 1988; LEWIS et al., 1983). En prévention secondaire, l'aspirine réduit de 30% la mortalité coronaire (ISIS-2 COLLABORATIVE GROUP, 1988), et de 50% le risque de récurrence d'infarctus et de réocclusion post angioplastie. L'aspirine à doses répétées produit un effet cumulatif sur la fonction plaquettaire en bloquant 20% à 30% de l'agrégation. Cependant, certaines études démontrent que l'activation plaquettaire persiste au cours de l'IM malgré le traitement à l'aspirine (GILES et al., 1994).

Parmi les nouveaux antiplaquettaires, le clopidogrel (Plavix®), est une thiénypyridine qui inhibe de façon spécifique la voie d'activation des plaquettes dépendante de l'ADP. L'association clopidogrel/aspirine est indiquée lors d'implantation d'endoprothèse et chez tous les groupes de patients à haut risque pour un événement cardiovasculaire. En effet, l'étude CURE (the Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events) a montré que le clopidogrel, à dose charge de 300 mg, suivie d'une prise quotidienne de 75 mg pour trois à douze mois, en association avec l'aspirine apporte un bénéfice additionnel pour les patients avec SCA sans segment ST, avec un très bon profil de tolérance et moins d'hémorragies gastro-intestinales par rapport à l'aspirine seul (MEHTA et YUSUF, 2000).

Le complexe GPIIb/IIIa constitue une nouvelle cible pour les médicaments antithrombotiques. Les antagonistes du récepteur GPIIb/IIIa sont des inhibiteurs

plaquettaires hautement sélectifs dont l'action dose-dépendante bloque complètement le fibrinogène en inhibant sa liaison au récepteur de la GPIIb/IIIa, et empêche ainsi l'agrégation des plaquettes. Ils se présentent sous forme de fragments d'anticorps monoclonaux à administrer par voie intraveineuse (abciximab, c7E3, Réopro[®]), de peptides cycliques (eptifibatid, Integrilin[®]), ou de molécules non peptidiques (tirofiban, Aggrastat[®]) (PRISM STUDY GROUP, 1998). En bloquant l'étape finale commune de l'agrégation plaquettaire, ces drogues sont considérées efficaces et plus puissantes que l'aspirine. Des études cliniques ont démontré que l'abciximab et d'autres antagonistes du récepteur GPIIb/IIIa sont capables de bloquer 80 à 90% de l'agrégation plaquettaire (MASCELLI et al., 1998 ; BIHOUR et al., 1999), elles confirment l'utilité des inhibiteurs du récepteur GPIIb/IIIa (Aggrastat[®], Integrilin[®]) au cours de l'intervention coronarienne percutanée chez les patients à haut risque (Réopro[®], Integrilin[®]) (HEESCHEN et al., 1999).

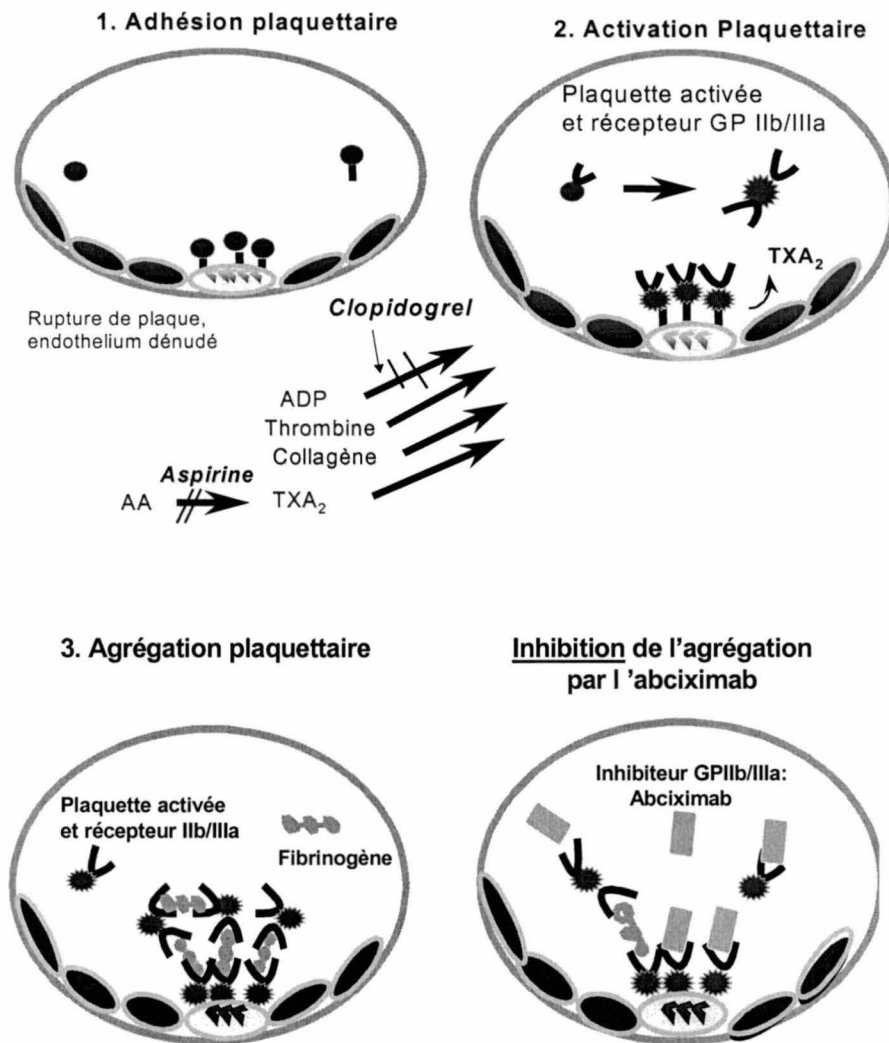


Figure 1. 6 : Mécanismes d'action des agents antiplaquettaires

L'abciximab composé des fragments Fab humanisés d'une IgG murine, est maintenant largement utilisé chez des patients où le risque thrombotique est considérablement augmenté au cours de la revascularisation coronarienne percutanée et la pose d'endoprothèse (THE EPIC INVESTIGATORS, 1994 ; DURRIEU-JAIS et al., 2000). Il est utilisé en association avec l'héparine et l'aspirine dans la prévention des complications ischémiques aiguës au cours de l'angioplastie, chez les patients à hauts risques. Ces patients bénéficient d'une diminution significative des événements cardiaques majeurs, à condition de privilégier la voie intraveineuse et en adaptant les posologies de manière individuelle. Il s'administre par voie intraveineuse, en une seule prise, dix minutes avant l'intervention à dose charge de 0,25mg/kg pendant l'ICP et 0,125 ug/kg/min en perfusion pendant douze heures. Ces produits vont bloquer le fonctionnement plaquettaire tout le long de leur persistance dans la circulation plasmatique et ils ont été incriminés dans la majoration de complications hémorragiques survenant le plus souvent au niveau des points de ponctions, ainsi que la persistance d'un risque hémorragique au-delà de l'arrêt de la perfusion. Son administration doit se faire en milieu spécialisé, strictement contrôlée. Pour éviter les complications hémorragiques et le risque de rethrombose, le relai est pris par une dose d'entretien de 75 mg par jour de clopidogrel prescrite pendant un mois en association avec l'aspirine qui est donnée selon un traitement d'entretien à long terme.

Certains auteurs préconisent d'étudier le retentissement biologique individuel sur le fonctionnement plaquettaire, notamment parce qu'il semble exister une importante variation interindividuelle de l'effet inhibiteur des antiplaquettaires (MASCELLI et al., 1997 ; SMITH et al., 1999). L'engouement pour leur utilisation doit être associé au contrôle de leur efficacité biologique et de leur tolérance clinique. Leur puissance antithrombotique, en grande partie corrélée à leurs caractéristiques pharmacodynamiques et pharmacocinétiques particulières, requiert l'appréciation du meilleur rapport bénéfice/risque hémorragique (ELALAMY, 1999).

En fait, si l'apport clinique de ces molécules reste incontesté, il reste à mieux définir les indications, les doses à administrer ainsi que leur durée de prescription. Néanmoins, une difficulté persiste dans la surveillance biologique de l'utilisation des antiplaquettaires, l'absence de tests simples en routine dans la surveillance de la thérapie (BIHOUR et al., 1999). Les études en cours et une parfaite collaboration pluridisciplinaire regroupant les investigateurs cliniques, les biologistes et l'industrie pharmaceutique, devraient apporter des éléments pratiques pour déterminer la dose optimale et le meilleur rapport efficacité / risque pour ces molécules du troisième millénaire (CAMOIN-JAU et SAMPOL, 2000). Les SCA rassemblent tous les ingrédients nécessaires pour attirer et susciter des actions concrètes : fréquence élevée, conséquences cliniques dramatiques, absence de paramètres de mesure de l'activation des plaquettes simples et pratiques.

L'objectif de cette étude est de pouvoir disposer d'un paramètre qui permettrait d'évaluer directement l'activation plaquettaire mesuré avec un instrument simple d'utilisation, chez des patients coronariens à risque élevé de complications thrombotiques, et qui sont sous antiplaquettaires. Les difficultés de l'exploration des plaquettes sont cependant importantes. En effet, la manipulation des plaquettes est très délicate, car elles ont tendance à s'activer facilement lors des procédures expérimentales *in vitro* (HEZARD et al.,1999), ce qui rend difficile leur évaluation *in vivo*. D'où notre intérêt primaire d'étudier au laboratoire, les conditions de mesures de l'activation des plaquettes.

1. 5 Méthode d'évaluation de l'activation plaquettaire

1. 5. 1 Procédures d'évaluation de l'activation des plaquettes *in vitro*

Les plaquettes sont des cellules facilement activables durant les procédures expérimentales et beaucoup de variables pré-analytiques peuvent affecter les résultats des analyses courantes de l'hémostase. Pour améliorer la précision et l'exactitude de l'essai au laboratoire, il est important de prendre des précautions d'usage pour minimiser le plus que possible l'impact de la manipulation des plaquettes. Ces variables pré-analytiques peuvent être classées dans trois catégories principales : collection de spécimen, transport et stockage des spécimens de sang avec un

anticoagulant et traitement de ces spécimens.

Il est important que le prélèvement ne contienne pas de fragments tissulaires susceptibles d'activer les plaquettes. Les contaminants tissulaires se retrouvent, après avoir été aspirés dans l'aiguille, essentiellement dans les premiers millilitres prélevés. et peuvent se voir également lorsque le prélèvement a été difficile (Mc PHEDRAN et al., 1974). La présence prolongée d'une aiguille le long d'une paroi endothéliale peut aussi entraîner une lésion de l'endothélium avec libération de facteur tissulaire pouvant induire l'activation des plaquettes. De nombreux facteurs, inhibiteurs ou activateurs de l'hémostase primaire, de la coagulation ou de la fibrinolyse peuvent alors être libérés par l'endothélium, susceptibles de perturber les résultats des tests. De plus, cela peut être aggravé par le maintien prolongé d'un garrot ; le prélèvement doit donc être fait rapidement après la pose du garrot quand ce dernier est nécessaire, et rapidement après l'introduction de l'aiguille dans la veine.

En somme, les spécimens de sang doivent être recueillis par ponction au pli du coude, avec des aiguilles de prélèvement adaptées et un garrot peu serré ou de préférence sans garrot. L'échantillon de sang ne doit pas être conservé longtemps à température ambiante, et l'anticoagulant choisi doit être capable de prévenir l'activation plaquettaire *in vitro*. Le citrate de sodium est l'anticoagulant le plus fréquemment utilisé pour l'analyse des plaquettes, mais il est déficient en raison de la difficulté de contrôle de l'osmolarité au cours des analyses fonctionnelles (SCHMITZ et al., 1998). L'Éthylènediamine-trétraacétique (EDTA) est couramment utilisé en

hématologie ; il forme un complexe avec le calcium nécessaire à la coagulation. Dans un délai d'une heure, les plaquettes sont stabilisées dans l'EDTA, mais on a rapporté que cet anticoagulant affecte beaucoup les plaquettes des échantillons de sang laissés longtemps à température ambiante après le prélèvement, et induit l'agrégation EDTA-dépendante, induisant des "fausses thrombopénies" (KÜHNE et al., 1995).

Le Citrate-Théophylline-Adénosine-Dipyridamole (CTAD : Becton Dickinson) est un anticoagulant contenant une solution de citrate trisodique avec théophylline, adénosine et dipyridamole. On a rapporté que le CTAD diminue l'activation des plaquettes en abaissant les concentrations plasmatiques du facteur 4 plaquettaire (RAY et al., 1993), prévient l'activation des plaquettes *in vitro* durant le temps de stockage des tubes à la température ambiante avant l'analyse (KÜHNE et al., 1995 ; OLSON et al., 1998) et convient à la mesure de la fonction des plaquettes *in vivo*. Il est donc particulièrement adapté à la surveillance des traitements anticoagulants par l'héparine, et/ou lorsque les contraintes de délai ne peuvent être respectées. Cependant, cet anticoagulant est particulièrement sensible à la lumière, les tubes doivent donc rester dans leur emballage étanche aux rayons lumineux ; la limitation à son emploi systématique est le surcoût généré. L'utilisation de la mesure de l'activation des plaquettes comme outil clinique courant exige des méthodes automatisées sensibles sans manipulation importante des plaquettes, avec un anticoagulant qui réduit l'activation plaquettaire *in vitro*.

1. 5. 2 Les instruments de mesure

Jusqu'aux années soixante, la numération et l'identification des cellules sanguines relevaient du seul domaine de la microscopie. Les compteurs de cellules développés depuis cette époque ont apporté un progrès important à la mesure quantitative. La plupart des instruments commercialisés utilisent la mesure de l'impédance électrique ou la mesure optique de la diffusion du laser ; ils mélangent et diluent automatiquement les échantillons pour fournir des analyses de plus en plus indépendantes de l'opérateur.

L'utilisation de la technique de dispersion de la lumière ou "light scattering" représente une nouvelle méthode dans l'évaluation de l'activation plaquettaire. Cette méthode a été largement utilisée dans l'estimation de la taille de la cellule, depuis que Mullaney et collaborateurs, ont montré que l'intensité de la lumière dispersée à petits angles (0.5 degrés- 2.0 degrés) d'un rayon incident est proportionnelle au volume des particules. Ceci a été démontré par la théorie de Mies pour les particules sphériques homogènes avec le même indice de réfraction (MULLANEY et al., 1969). Les appareils qui réalisent ces mesures sont des cytomètres analyseurs et trieurs de cellules ; ils permettent d'effectuer la quantification d'une diffusion de lumière et de fluorescence, émise par les cellules lorsqu'elles traversent un rayon laser utilisé comme source d'excitation lumineuse.

Parmi les techniques qui permettent, en investigation clinique, d'avoir une meilleure approche dans l'évaluation des pathologies plaquettaires, via le principe de la dispersion de la lumière, se situe la cytométrie de flux par immunofluorescence, et une nouvelle application de la cytométrie, le système hématologique automatisé commercialisé sous le nom de ADVIA 120 (TYCKO et al., 1985 ; ZELMANOVIC et HETHERINGTON, 1998).

1. 5. 2. 1 La cytométrie de flux : technique d'immunofluorescence

La cytométrie de flux par immunofluorescence reconnaît l'activation plaquettaire par l'expression de la P-sélectine . Cette composante des granules alpha des plaquettes au repos est exprimée à la surface de la membrane des plaquettes après libération du contenu granulaire suite à l'activation plaquettaire (STENBERG et al., 1985 ; Mc EVER, 1990 ; SCHLOSSMAN et al., 1993 ; MICHELSON, 1994). Elle met en jeu des technologies relevant de la dynamique des fluides, des lasers, de l'optique, de l'électronique et de l'informatique. Ces mesures sont faites sur des cellules isolées, circulant dans une phase liquide, appelée flux ; l'appareil qui réalise ces mesures est un cytomètre analyseur. Il permet d'effectuer la quantification de la diffusion de lumière et de la fluorescence émise par les cellules marquées à l'aide d'un anticorps monoclonal CD62 conjugué à un fluorochrome, la phycoérythrine (PE), lorsqu'elles traversent un rayon laser utilisé comme source d'excitation.

Les plaquettes sont des cellules qui donnent une faible diffusion de la lumière sous un petit angle et à 90 degrés. Cette cellule est anucléée mais contient de nombreux organites. La membrane cellulaire contient différentes protéines analysées par cytométrie de flux (GRUEL et al., 1986). La P-sélectine et la GPIIb/IIIa font parties de ces molécules ; elles sont révélées par des anticorps monoclonaux spécifiques à ces protéines. Le développement de la technique de cytométrie de flux et l'apparition simultanée d'anticorps monoclonaux spécifiques à chaque glycoprotéine ont permis de réaliser des progrès considérables dans le domaine de l'analyse plaquettaire. Cette méthode permet une analyse du profil des membranes plaquettaires et la détection des plaquettes activées dans la circulation, la translocation des Glycoprotéines (P-sélectine, granulophysine), et/ou l'apparition de modifications conformationnelles au niveau du complexe GPIIb/IIIa. La cytométrie de flux est actuellement la technique de référence (MICHELSON, 1996; MICHELSON et FURMAN, 1999). Elle a démontré la présence de plaquettes activées chez les patients avec AI et IM (SCHULTHEISS et al., 1994 ; BECKER et al., 1994).

La cytométrie de flux permet de détecter *in vivo* des marqueurs localisés sur la membrane des plaquettes activées circulantes (KNIGHT et al., 1997 ; TSCHOEPE et al. 1993). La variété des anticorps augmente régulièrement, ce qui permet d'étudier de plus en plus d'aspects de l'activation plaquettaire. Toutefois, différents problèmes doivent être pris en considération ; ainsi cette technique n'est pas applicable à tous les types d'anti-GPIIb/IIIa (NURDEN et al., 1997).

La cytométrie de flux a ses avantages et ses limites. Parmi ses avantages, c'est une méthode de référence permettant la quantification directe de l'activation, elle détecte la présence dans la circulation de plaquettes activées, au cours de l'AI et l'IM (MICHELSON, 1996 ; FURMAN et al., 1998). De plus, elle montre une activation plaquettaire au cours de l'ICP dans le sang prélevé du sinus coronaire (MICHELSON, 1996). La cytométrie de flux peut être utile dans la surveillance de la thérapie antiplaquettaire, au cours des SCA (LANGFORD et al., 1996 ; AULT et al., 1999), chez les patients porteurs d'une endoprothèse coronarienne (GAWAZ et al., 1996 ; NEUMANN et al., 1997) et peut prédire les risques élevés de survenue d'évènements ischémiques aigus avant angioplastie (TSCHOEPE et al., 1993) et subaigus après angioplastie (GAWAZ et al., 1997). Parmi ses limites, on note la manipulation excessive des plaquettes, ce qui peut induit une activation *in vitro* ; sa difficulté d'usage en routine et un coût d'utilisation de cette technique très élevé.

1. 5. 2. 2 Le système hématologique automatisé : ADVIA 120 (Bayer Diagnostic)

L'ADVIA 120 est un système d'analyse hématologique entièrement automatisé, il est utilisé à travers le monde dans les laboratoires pour l'analyse des échantillons sanguins, il fournit les paramètres d'une Formule de Numération Sanguine en offrant un débit de 120 échantillons à l'heure. L'ADVIA 120 évalue l'activation plaquettaire par déviation du faisceau lumineux. L'appareil détecte le changement de forme de la

plaquette “shape change” de même que le changement de densité qui accompagne le début de l’activation plaquettaire. Ceci est exprimé par la concentration moyenne des composants de la plaquette ou MPC (Mean platelet component concentration). On a récemment démontré que cette analyse à deux dimensions des plaquettes fournit un moyen plus fiable pour obtenir des paramètres plaquettaires précis (FISHER et al., 1997).

L’ADVIA 120 se base sur la théorie de Mie pour des sphères homogènes et utilise la mesure de deux dimensions de la dispersion de la lumière, à angle faible ($2-3^\circ$) et élevé ($5-15^\circ$). Un laser diode est utilisé comme source d’excitation lumineuse. Cet instrument de mesure représente une version modifiée de la méthode de cytométrie de flux avec utilisation de l’analyse à deux dimensions des plaquettes. Il distingue les plaquettes des érythrocytes sur la base de leur taille. Les plaquettes sont décrites dans un cytogramme qui est la représentation graphique de la dispersion de la lumière en deux dimensions, par leur taille de 1 à 30 fL (fintolitre) et d’indice de réfraction de 1,35 à 1,40. Le volume et l’indice de réfraction sont alors convertis en composant et masse de plaquette à partir desquels le MPC est obtenu (ZELMANOVIC et al., 1998 ; KUNICKA et al., 1998 ; STANWORTH et al., 1999). Cet indice de réfraction des plaquettes est lié linéairement à la densité des plaquettes qui est une mesure de la concentration globale du contenu plaquettaire et indirectement, un indice d’activation des plaquettes lorsque ce contenu est libéré (ZELMANOVIC et al., 1998 ; CHAPMAN et al., 2003). Par ailleurs le MPC, exprimé en g/dl, représente la mesure

de l'indice réfractaire moyen des plaquettes et a été suggéré comme test pouvant être utile dans l'évaluation de l'activation des plaquettes (MACEY et al., 1999).

Chapman et ses collaborateurs étaient intéressés à savoir au cours d'une étude préliminaire, si les changements du MPC mesuré par l'ADVIA 120, pouvaient bien refléter des changements de l'état d'activation des plaquettes dans le sang de sujets sains, stimulé avec de la thrombine, inducteur d'activation des plaquettes. Les résultats du MPC ont été comparés à ceux de l'expression de CD62P, mesurée par la cytométrie de flux. Les résultats obtenus indiquent qu'il y avait une excellente corrélation entre l'expression de CD62P et le MPC ($r = 0.85$) et que celui-ci correspondent bien à l'activation plaquettaire mesurée par l'expression de CD62P par cytométrie de flux. Les auteurs concluent que le MPC est un paramètre intéressant et utile dans la mesure de la densité des plaquettes et la détection de l'activation des plaquettes, et pourrait être utilisé pour évaluer en routine les désordres plaquettaires (CHAPMAN et al., 2003).

Parmi les avantages de la technique automatisée ADVIA 120, on peut noter qu'elle ne nécessite pas la manipulation des plaquettes, ni aucune préparation, qu'elle donne une analyse rapide, multiparamétrique et directe de l'activation et enfin son coût est peu élevé à l'unité. La composante d'analyse bidimensionnelle des plaquettes, du système hématologique automatisé l'ADVIA 120 peut présenter un moyen de mesure clinique rapide d'activation des plaquettes. La technologie de dispersion de la

Lumière employée pour évaluer le volume des cellules, et l'indice de réfraction sont une approche intéressante pour détecter les changements de forme et de densité des plaquettes lors de l'activation des plaquettes. La mesure de la concentration moyenne de contenu des plaquettes (MPC) est un indicateur du changement de densité de plaquettes, en corrélation avec l'expression de P-sélectine mesurée par la cytométrie de flux (MACEY et al., 1999).

1. 6 Mesure de l'agrégation des plaquettes

1. 6. 1 L'agrégométrie

Dans certains cas, il est nécessaire pour étudier les fonctions plaquettaires, d'avoir recours à des tests *in vitro* spécialisés. L'agrégométrie est un test fonctionnel spécifique de l'agrégation des plaquettes qui consiste à étudier les courbes d'agrégation plaquettaire en présence d'inducteurs d'agrégation : ADP, collagène, thrombine, ristocétine, acide arachidonique... Cependant, cette technique nécessite la séparation des plaquettes du reste du sang, ce qui affecte la fonction des plaquettes et peut influencer les résultats. De plus, cette technique a des problèmes de standardisation, ce qui restreint son utilisation y compris dans les laboratoires spécialisés. En plus cette technique exige un personnel fortement spécialisé (WHITE et JENNINGS, 1999).

1. 6. 2 Le PFA-100

Le monitoring des inhibiteurs des GPIIb/IIIa requiert l'utilisation d'autres tests comme le PFA-100 (Dade Behring) qui a été développé comme un essai in vitro rapide mesurant quantitativement la fonction plaquettaire, en déterminant le temps de formation d'un agrégat plaquettaire. Le sang entier est aspiré par une ouverture de diamètre de 150 µm dans une membrane enduite de collagène et d'épinéphrine (Col/Epi) ou d'adénosine 5'-diphosphate (Col/ADP). Cet intervalle de temps de formation de l'agrégat est appelé temps de fermeture (Closure time). Il représente la mesure du temps requis pour les plaquettes pour s'agréger dans un échantillon de sang entier afin d'assurer l'occlusion d'un micropore (MADAN et al., 2002).

Le PFA-100 est un instrument dans lequel le processus d'adhésion et d'agrégation des plaquettes à la suite de dommages vasculaires est simulé in vitro. La formation de thrombus plaquettaire est affectée par des taux de plaquettes bas, et/ou l'activation des plaquettes, par des anomalies du facteur de Von Willebrand plasmatique et par l'aspirine. Il est donc sensible au taux de plaquettes inférieurs à 100.000 /mm³, aux thrombopathies, à l'anémie, et à la prise d'aspirine et héparine. L'essai pourrait potentiellement remplacer le temps in vivo de saignement (FRANCIS et al., 1999) et devenir ainsi un excellent outil de base pour évaluer des échantillons provenant des patients présentant une dysfonction plaquettaire (MAMMEN et al., 1998). Dans cette étude, le PFA-100 est utilisé pour l'évaluation de l'effet antiagrégant du traitement

antiplaquettaire à l'abciximab au cours des SCA et de l'ICP.

1. 7 Évaluation clinique

Le rôle central des plaquettes dans la thrombose artérielle est bien établi (FUSTER et al., 1992). La dégranulation plaquettaire suite à l'activation des plaquettes ainsi que l'agrégation plaquettaire sont augmentés dans le sang des patients avec AI et IM (SMITHERMAN et al., 1981 ; BECKER et al., 1994) et sont associés à une plus grande incidence de mortalité (FITZGERALD et al., 1986; TRIP et al., 1990).

Les antiplaquettaires ont démontré une diminution des accidents vasculaires (infarctus, ou décès) chez les patients présentant un ou plusieurs facteurs de risque. Chez ces patients asymptomatiques, un arrêt de courte durée des antiplaquettaires doit théoriquement influencer peu la maladie athéromateuse hormis le rebond hyperthrombotique lié à l'arrêt du traitement et le risque théorique d'hypercoagulabilité lié à l'acte chirurgical.

En prévention secondaire, les antiplaquettaires réduisent les événements cardiovasculaires d'environ 27 % après un infarctus (MONTALESCOT, 2000). Cet effet est plus important dans le premier mois qui suit l'événement cardiovasculaire initial et le risque d'arrêt des antiplaquettaires n'est pas négligeable. Il est augmenté en présence d'événements cardiovasculaires récents, lors d'un arrêt des antiplaquettaires

de plus de trois jours, en présence de facteurs d'hypercoagulabilité tels que le syndrome des antiphospholipides, une thrombocyémie, une prédisposition génétique. Selon certains auteurs, l'activation continue des plaquettes en dépit de l'utilisation de la thérapie antiplaquettaire chez les sujets avec SCA peut refléter l'insuffisance du traitement (SCHNEIDER et al., 1997).

Les interventions mécaniques sur les lésions d'athérome représentent la troisième grande indication des antiplaquettaires. Cette indication est issue des études de Schwartz qui a montré une réduction des événements aigus arrivant dans le premier mois suivant une angioplastie coronaire et une diminution du risque de thrombose de l'endoprothèse intra-coronaire par la combinaison de deux antiplaquettaires. Le recours aux antiplaquettaires est nécessaire pendant au moins quatre semaines, au mieux trois mois, pour permettre à l'endothélium de se reconstituer au niveau de l'endoprothèse. Ainsi tout arrêt des antiplaquettaires avant la sixième semaine est à éviter (SCHWARTZ et al., 1988).

Si l'aspirine réduit le risque d'événement cardiovasculaire d'environ 25 % chez une large majorité de patients atteints de pathologie cardiovasculaire, son efficacité est diminuée par le fait que 10 à 20 % d'entre eux feront une récurrence thrombotique ou ischémique au cours du suivi. En dépit de la thérapie à l'aspirine, l'activation des plaquettes persiste chez les patients présentant l'IM (GILES et al., 1994) et chez ceux traités avec les agents thrombolytiques (FITZGERALD et al., 1988). La raison de cette "résistance" peut tenir au fait que d'autres voies d'activation plaquettaire existent,

que certains patients peuvent avoir besoin de doses plus élevées que 75 mg/j et qu'enfin certains patients continuent à générer du thromboxane A2 malgré des doses thérapeutiques efficaces, même si les faibles doses d'aspirine prescrites bloquent 95 % de la cyclooxygénase de type 1 (cox-1). La cox-1 est décrite comme un enzyme responsable de la production de thromboxane A2 et de prostaglandines. Le système monocyte-macrophage est également une source importante de thromboxane A2, dont la production est un peu inférieure de celle des plaquettes. Ces cellules ont également un récepteur au thromboxane A2. Dans le macrophage, à l'inverse, c'est la cyclooxygénase de type 2 (cox-2) inductible qui est l'enzyme responsable de la majeure partie du métabolisme de l'acide arachidonique. Contrairement à la plaquette, le macrophage peut resynthétiser de nouvelles protéines cox-2 après avoir été inhibé par l'aspirine. Il en résulte la possibilité que de faibles doses quotidiennes d'aspirine puissent être insuffisantes pour inhiber de façon maximale la cox-2 macrophagique. Aussi le macrophage de la plaque d'athérome peut contribuer à une production résiduelle de thromboxane A2, qui n'est pas inhibé par les faibles doses d'aspirine et peut activer en retour les plaquettes (MONSUEZ, 2002).

La ticlopidine et le clopidogrel montrent une efficacité supérieure à l'aspirine. Ces deux molécules ne peuvent pas être administré en période pré et post opératoire en raison d'un risque hémorragique trop important, à la différence de l'aspirine. Néanmoins la régénération plaquettaire est réalisée pour moitié, trois jours après l'arrêt de l'antiagrégant, ce qui pour un taux plaquettaire de 250 000/mm³ correspond

à 125 000/mm³ plaquettes efficaces ; le temps d'arrêt en fonction du risque hémorragique peut être alors modulé. D'autre part, les inhibiteurs de la GPIIb/IIIa s'avèrent vitaux pour le patient à risque élevé d'évènements ischémiques ; le risque hémorragique et la possibilité de le maîtriser reste le second facteur déterminant de la poursuite des antiagrégants en post-opératoire.

En d'autres termes, on se rend compte que la prise en charge périopératoire d'un patient sous antiplaquettaires au cours d'une ICP, nécessite une réflexion et une évaluation du rapport risque/bénéfice de la poursuite du traitement antiplaquettaire. L'introduction des inhibiteurs de la fonction plaquettaire et notamment les antagonistes de la GPIIb/IIIa en tant que nouvelle classe des agents thérapeutiques soulève plusieurs questions importantes. Tout d'abord, si la dose administrée améliore la sécurité et/ou l'efficacité de la thérapie. Par la suite, si l'on dispose d'une analyse simple, rapide, et assez peu coûteuse dans la pratique clinique pour évaluer l'efficacité de la thérapie. Conceptuellement, la première question peut être subdivisée en trois questions séparées. La première est s'il y a des variations interindividuelles significatives aux doses actuellement recommandées des agents inhibiteurs. La seconde est si les variations observées de la réponse se corrélient avec des résultats cliniques. Par exemple, les patients qui ont une inhibition modérée de la fonction des plaquettes ou le plus bas pourcentage des récepteurs GPIIb/IIIa bloqués ont des complications thrombotiques, ou les patients qui ont une importante inhibition

de fonction des plaquettes ou le pourcentage le plus élevé des récepteurs bloqués de la GPIIb/IIIa ont des complications plus hémorragique. Si de telles corrélations sont établies, la troisième question est si l'ajustement de la dose du médicament sur la base des résultats de l'analyse de surveillance améliore réellement l'efficacité ou la sûreté.

Ainsi, pour l'abciximab qui inhibe l'agrégation plaquettaire en bloquant le récepteur GPIIb/IIIa, la surveillance est nécessaire. La dose charge de 0,25mg/kg pendant l'ICP et 0,125 ug/kg/minutes en perfusion pendant 12 heures, a été exigée pour réaliser et soutenir un blocage du récepteur supérieur ou égal à 80% chez la plupart des patients (JORDAN et al., 1996). Un tel blocus à haute teneur de récepteur est exigé pour empêcher les complications ischémiques en réponse aux complications thrombotiques graves observées dans le cadre d'une ICP (GOLD et al., 1990 ; COLLIER et al., 1995). Les études précédentes de pharmacocinétique de l'abciximab (JORDAN et al., 1996; TCHENG et al., 1994) et des données de Mascelli et collaborateurs appuient ces données (MASCELLI et al., 1997).

Cependant, on a observé quelques variations interindividuelles de bloc du récepteur ; d'ailleurs, il est prévisible que les patients avec une thrombocytose grave ne réaliseront pas un degré de bloc de récepteur aussi haut que des patients présentant des comptes de plaquette normaux, et un cas édité a documenté ce phénomène (SIMOONS et al., 1994). Ainsi, une évaluation systématique de l'effet des comptes de plaquettes élevés sur l'efficacité de l'abciximab serait souhaitable, et les ajustements de doses dans ce sous-groupe offrent des possibilités intéressantes d'améliorer l'efficacité.

Ainsi, le compte des plaquettes a été évalué dans cette étude.

Utiliser un test fonctionnel explorant directement la fonction des plaquettes pour surveiller la thérapie antiplaquettaire a l'avantage théorique d'évaluer directement le but de la thérapie. Par exemple, un patient peut recevoir une dose d'un antagoniste du GPIIb/IIIa qui produit le blocage du récepteur GPIIb/IIIa, mais si ce patient a un compte de plaquette dans la limite inférieure, et prend d'autres médicaments ou a des maladies qui affectent la fonction des plaquettes, l'impact inhibiteur peut être excessif. Cette étude est la première qui vise à évaluer l'utilité du MPC, comme indicateur d'activation des plaquettes, chez des patients considérés à risque de développer des événements thrombotiques. Le choix de notre population à l'étude s'est porté sur un groupe de patients avec un diagnostic d'AI ou d'IM et l'indication d'antiplaquettaires.

1. 8 Hypothèses de recherche et objectifs

1. 8. 1 Hypothèses de recherche

L'étude des plaquettes activées est pertinente chez les patients coronariens et l'utilisation des antiplaquettaires fait partie intégrale de la pratique thérapeutique courante dans la prise en charge de ces patients. Nous voulons évaluer l'activation plaquettaire par une méthode de mesure automatisée comparativement avec une méthode de référence non accessible en routine, afin de déterminer la présence ou l'absence de plaquettes activées, dans une population de patients qui reçoivent des antiplaquettaires selon un protocole thérapeutique élaboré et d'évaluer la relation entre les deux mesures d'activation plaquettaire et la prise d'antiplaquettaires. Ceci, pour investiguer la possibilité qu'une méthode de mesure de l'activation plaquettaire exprimée par le MPC (mean platelet component), accessible en routine, en respectant les conditions de mesure des plaquettes sanguines, puisse surveiller des patients considérés à risque et qui nécessite la prise d'antiplaquettaires. D'autre part, des interactions cellulaires sont observées entre les plaquettes et les cellules inflammatoires qui libèrent des cytokines augmentant le risque d'activation plaquettaire. Ces données suscitent notre intérêt d'étudier la relation entre le paramètre de l'activation plaquettaire (MPC) et celui de l'inflammation (PCR).

Nos hypothèses sont que :

1. L'étude des différents anticoagulants (EDTA, citrate de sodium et CTAD (Citric acid, théophylline, adénosine, dipyridamole) permet de mesurer la capacité de chacun d'eux à prévenir l'activation plaquettaire *in vitro*.
2. L'ADVIA 120, en mesurant le paramètre plaquettaire MPC, permet de détecter la présence ou l'absence de plaquettes activées, chez les patients soumis à une angioplastie coronarienne et possiblement l'efficacité des antiplaquettaires sur l'activation des plaquettes.

1. 8. 2 Objectifs de l'étude

1. 8. 2. 1 Objectif général

Établir les conditions de mesure du MPC par le système automatisé ADVIA 120, et utiliser le MPC pour mesurer l'activation plaquettaire basale et la réponse au traitement dans une population de coronariens avec médication antiplaquettaire.

1. 8. 2. 2 Objectifs spécifiques

1. Étudier les conditions de mesures de l'activation des plaquettes *in vitro*.
 - a) Comparer la capacité de différents anticoagulants (EDTA, citrate de sodium et CTAD (Citric acid, théophylline, adénosine, dipyridamole) à prévenir l'activation des plaquettes *in vitro*.
 - b) Comparer l'évaluation de l'activation des plaquettes par deux techniques : la cytométrie de flux et le système hématologique automatisé, l'ADVIA 120.
2. Décrire l'activation des plaquettes chez des patients coronariens qui sont, selon un protocole clinique pré-établi, sous inhibiteurs de la fonction plaquettaire avec des mécanismes d'actions différents (aspirine et clopidogrel ou abciximab), lors d'une angioplastie, avant et après prise médicamenteuse à des intervalles de temps

différents: deux heures, cinq heures et vingt quatre heures pour le groupe clopidogrel ; dix minutes, deux heures et vingt quatre heures pour le groupe abciximab.

- Détecter la présence ou l'absence d'activation plaquettaire et mesurer l'agrégation des plaquettes avant traitement, ainsi que la réponse au traitement antiplaquettaire mesurée à des intervalles de temps différents : deux heures, cinq heures et vingt quatre heures pour le groupe clopidogrel ; dix minutes, deux heures et vingt quatre heures pour le groupe abciximab sur l'activation et l'agrégation plaquettaire.
3. Étudier l'association entre l'activation plaquettaire et d'autres marqueurs du SCA, tel que l'inflammation (PCR) et la nécrose (TnI).

CHAPITRE 2 : MÉTHODOLOGIE

Cette étude est la première à utiliser la mesure de la densité cellulaire des plaquettes exprimée par le MPC, dans l'évaluation de l'activation plaquettaire chez des patients coronariens sous traitement antiplaquettaire. Pour mener à bien cette étude, il est important en premier de définir les conditions de mesures de l'activation des plaquettes, afin d'éviter le plus que possible d'induire une activation plaquettaire durant les procédures expérimentales ; depuis le prélèvement sanguin jusqu'au choix de l'anticoagulant sur lequel doit être collecter le sang total.

2.1 Dispositifs de l'étude

Cette étude quantitative suit plusieurs dispositifs de recherche afin de répondre aux différents objectifs. L'étude comparative transversale de traitements permet de répondre au premier objectif qui est d'étudier les conditions de mesures de l'activation des plaquettes *in vitro*. L'évaluation de l'activation des plaquettes par deux méthodes de mesure: la cytométrie de flux et le système hématologique automatisé, l'ADVIA 120 est une étude comparative de deux techniques. La description de l'activation des plaquettes chez des patients coronariens est une étude comparative temporelle en pré et post. Les mesures prises avant l'administration d'antiplaquettaire (phase pré-thérapeutique : avant

intervention) sont comparées aux mesures prises après son administration (phase post-thérapeutique : après intervention). La phase pré-thérapeutique nous permet de déterminer si la valeur du MPC reflète bien un état d'activation des plaquettes. La phase post-thérapeutique permet d'évaluer la réponse des plaquettes aux inhibiteurs plaquettaires. Quant à l'étude de l'association entre l'activation plaquettaire et d'autres marqueurs du SCA, tel que l'inflammation (PCR) et la nécrose (TnI) est une étude corrélationnelle.

2. 2 Population à l'étude et recrutement

2. 2. 1 Définition de la population :

La population visée par notre étude a été constituée sur la base d'un choix raisonné (échantillon de convenance). Il s'agit de tous les patients coronariens admis seulement de jours du Lundi au Vendredi de la semaine, dans l'unité d'hémodynamie pour ICP élective et thérapie antiplaquettaire durant la période de recrutement délimitée dans cette étude. Les patients sont recrutés dès leur admission à l'unité d'hémodynamie du centre hospitalier universitaire de Sherbrooke, avant la procédure d'ICP et la prise de la dose charge d'antiplaquettaires, clopidogrel ou abciximab pour des prélèvements sanguins (phase pré-thérapeutique). Les patients sont revues après la procédure pour une autre série de prélèvement à des intervalles de temps différents : deux heures, cinq heures, vingt

quatre heures après la prise de clopidogrel et dix minutes, deux heures, vingt quatre heures après la prise d'abciximab (phase post-thérapeutique). Six semaines et trois mois après leur congé de l'hôpital, ces patients sont contactés par téléphone, pour vérifier leur état de santé, de noter la survenue d'évènements cliniques comme les douleurs thoraciques, une éventuelle réhospitalisation avec angioplastie ou autres complications d'origine coronarienne.

2. 2. 2 Critères d'admissibilité

Pour être admissible à l'étude, les participants doivent présenter les critères suivants :

- Être âgé(e) de 21 ans et plus;
- Avoir un diagnostic de SCA;
- Être admissible à une ICP élective au moins 24 heures après l'évènement aigu ;
- Être sous médication antiplaquettaire à base de clopidogrel (Plavix®) ou abciximab (Réopro®);
- Avoir donné son consentement libre et éclairé.

Sont exclus les patients suivants :

- Les patients recevant en association les deux médicaments antiplaquettaires, clopidogrel et abciximab en dose charge durant l'angioplastie;
- Les patients présentant une intolérance ou allergie à l'un ou l'autre médicament ;
- Les sujets ayant refusé de participer à l'étude.

Cette étude comprend donc, suivant l'agent antiplaquettaire prescrit par le cardiologue et administré au patient durant l'angioplastie, deux groupes de patients, le groupe recevant le clopidogrel et le groupe recevant l'abciximab. En aucun cas, nous ne faisons de comparaison entre les deux groupes. Par contre, nous évaluons l'effet de chaque antiplaquettaire sur la fonction des plaquettes. Notre étude a été approuvée par le comité d'éthique du centre hospitalier universitaire de Sherbrooke.

2. 2. 3 Stratégie de recrutement

Les patients sont recrutés du Lundi au Vendredi de la semaine et seulement de jour. Pour des raisons liées à l'entretien et à la calibration du système hématologique ADVIA 120, nécessaire avant l'analyse des spécimens sanguins rendent l'instrument de mesure non disponible ni de soir ni les fins de semaines. Ainsi que la non disponibilité de l'instrument de mesure, la cytométrie de flux au niveau du service d'immunologie durant ces mêmes périodes de temps. Grâce à la collaboration du personnel médical et paramédical du service d'hémodynamie, le recrutement des patients s'est fait en deux étapes. À leur admission en salle d'hémodynamie, qui représente la première étape, les patients rencontrent d'abord l'infirmière qui leur demande leur approbation initiale pour participer à l'étude, tout en leur donnant des explications brèves sur le projet et leur

demande l'autorisation de prélever du sang, avant et après l'administration de la dose charge de clopidogrel ou d'abciximab, en précisant que le responsable du projet les rencontrerait plus tard, dès leur retour dans leur chambre d'hôpital pour les formalités officielles d'usage concernant leur consentement.

Dès que le patient manifeste son approbation, l'infirmière fait les prélèvements sanguins par ponction veineuse de l'avant bras, avant prise médicamenteuse de la dose charge de clopidogrel ou d'abciximab. Durant la deuxième étape, le responsable du projet rencontre le patient, l'informe sur le projet, l'invite à participer et à signer son consentement, lui explique les objectifs de la recherche ainsi que l'implication de sa participation, les avantages et les inconvénients de l'étude. Il lui demande l'autorisation d'utiliser les prélèvements de sang ultérieures, d'accéder à son dossier médical et de signer le formulaire de consentement approuvé.

Par la suite, le patient reçoit en plus de sa dose quotidienne d'aspirine, une dose charge de 300 mg de clopidogrel pendant l'ICP et 75 mg pendant 28 jours, ou de l'Abciximab à dose charge de 0,25mg/kg pendant l'ICP et 0,125 ug/kg/min en perfusion pendant 12 heures, suivi d'un traitement d'entretien à base de clopidogrel, à la dose de 75 mg par jour. Des prélèvements semblables aux précédents à des temps différents sont faits : deux heures, cinq heures et vingt quatre heures après la dose charge de clopidogrel et dix minutes, deux heures et vingt quatre heures après la dose charge d'abciximab afin d'étudier le comportement des plaquettes sous l'action de l'antiplaquettaire.

2. 3 Instruments de mesure

2. 3. 1 Mesure de l'activation des plaquettes

L'utilité du paramètre plaquettaire, MPC, indicateur du changement de densité des plaquettes, mesuré par le système hématologique automatisé ADVIA 120 (MACEY et al., 1999), sera étudiée comparativement au CD62P, mesuré par la cytométrie de flux par immunofluorescence.

2. 3. 1. 1 La Cytométrie de flux : Technique d'immunofluorescence

Dans le domaine de l'analyse plaquettaire, la cytométrie de flux est citée dans la littérature scientifique comme une méthode de référence. Le marqueur de l'activation plaquettaire utilisé dans la cytométrie de flux est la P-sélectine ou CD62P, glycoprotéine de la membrane des granules alpha de la plaquette au repos, exprimée à la surface des plaquettes activées (Mc EVER, 1990 ; MICHELSON, 1996 ; MICHELSON et FURMAN, 1999 ; AULT et al., 1999 ; ZELLER et al., 1999 ; MICHELSON et al., 2001).

- **Principe de mesure de la cytométrie de flux**

La cytométrie de flux permet l'étude précise de cellules isolées entraînées dans un flux liquide. Les cellules en suspension dans une solution saline, guidées dans un fin capillaire jusqu'à l'extrémité d'une buse, alignées les unes derrière les autres et séparées, défilent à grande vitesse (plus de 30 km/h) devant une source lumineuse, le plus souvent un laser. Le faisceau lumineux du laser est très fin, ce qui permet de le focaliser sur une seule cellule à la fois, et limite beaucoup le "bruit de fond". Le passage des cellules dans un cytomètre est précédé d'une étape de fixation des plaquettes avec du formaldéhyde pour prévenir leur activation spontanée et d'un marquage par immunofluorescence indirecte avec des anticorps monoclonaux spécifiques, conjugués à des fluorochromes pour identifier les plaquettes activées. Le laser excite le fluorochrome présent, qui émet une fluorescence séparée et transformée en signal électrique reconnu par une cellule photoélectrique. Les signaux de diffusion et de fluorescence (photons) sont captés par des détecteurs qui les transforment en signaux électriques traités par un système informatique. Chaque cellule est ainsi transformée en " évènement électrique " (event) avec plusieurs coordonnées (taille, granularité, fluorescence 1, fluorescence, 2...). Ces évènements électriques forment des nuages de points (sur des cytogrammes) autour desquels on dessine des fenêtres électroniques (gating). Au sein de chaque fenêtre, il est possible de préciser la distribution de la fluorescence (histogramme de distribution de fréquences).

Pour chaque cellule, sont mesurées très précisément la fluorescence émise et la lumière diffusée, recueillie dans deux directions différentes, soit dans l'axe du laser, soit à 90° ce qui donne respectivement une information sur la taille (FSC : forward angle light scatter, petit angle) et sur la structure ou granularité (SSC : side scatter, grand angle) de chacune des cellules. La vitesse d'analyse (5000 événements/secondes) permet l'étude d'un nombre important de cellules et les résultats sont exprimés en pourcentage de fluorescence. L'expression de CD62P peut être rapidement mesurée par immunofluorescence, en utilisant un anticorps monoclonal spécifique, le CD62 conjugué à un fluorochrome, la phycoérythrine (PE). Il faut noter que pour une dizaine de spécimens d'un même sujet, la cytométrie par immunofluorescence a une variabilité de ± 2 à 5 % et sa précision est de 95 à 98 % pour le même type cellulaire.

2. 3. 1. 2 Le système hématologique automatisé ADVIA 120

L'ADVIA 120 est un instrument de mesure automatisé récent, qui peut fournir des paramètres sanguins utilisés en routine dans de nombreux laboratoires, incluant la numération cellulaire : globules blancs, globules rouges, réticulocytes et plaquettes.

▪ Principe de mesure de l'ADVIA 120

L'ADVIA 120 est un cytomètre analyseur automatisé utilisant le même principe que la cytométrie de flux. Il utilise comme source lumineuse le laser à l'iode, qui produit un rayon monochromatique de 675 nm, et les plaquettes sont hydrodynamiquement focalisées dans la cellule d'écoulement pour défiler une par une à travers la lumière émise par le laser. L'assemblage optique est conçu sur la base de la théorie de Mie sur la dispersion de la lumière pour des sphères homogènes, et détecte les signaux de dispersion à deux angles qui sont transformés en valeurs pour le volume et l'indice de réfraction (n). Le cytogramme de dispersion des plaquettes (PLT) est la représentation graphique de deux mesures de dispersion de lumière : la dispersion à grand angle (5° à 15°) à gain élevé est reportée sur l'axe des abscisses, tandis que la dispersion à angle faible (2° à 3°) est reportée sur l'axe des ordonnées. Les signaux à gain élevé sont utilisés pour l'analyse des plaquettes (figure 2. 1 et figure 2.2). Le cytogramme des plaquettes montre le rapport entre les mesures de la dispersion de la lumière et les caractéristiques, cellule par cellule, du volume et de l'indice de réfraction. Le cytogramme inclut des volumes entre 0 et 30fl (fl :fintolitre) et un indice de réfraction entre 1,350 et 1,400 (ZELMANOVIC et al., 1998 ; KUNICKA et al., 1998; STANWORTH et al., 1999). Le volume et l'indice de réfraction, basé sur la dispersion de la lumière du laser, identifient différentes plaquettes. L'indice de

réfraction de la plaquette est lié à la densité, exprimée comme la concentration moyenne des composants de plaquette (MPC, Mean platelet component, exprimé en g/dl).

L'activation plaquettaire s'accompagne du changement de forme et de la libération du contenu des granules denses et alpha des plaquettes, qui se traduit par une baisse de la concentration plaquettaire. Cette caractéristique du comportement des plaquettes pourrait être un indicateur de l'activation des plaquettes sanguines (MACEY et al., 1999 ; CHAPMAN et al., 2003).

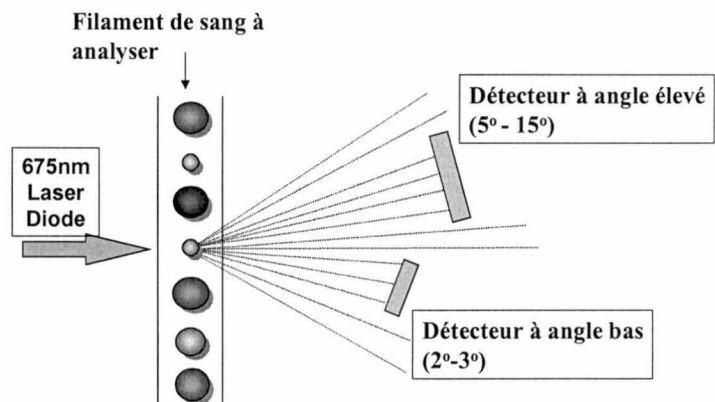


Figure 2. 1 : Principe d'analyse des plaquettes par le cytomètre analyseur l'ADVIA 120

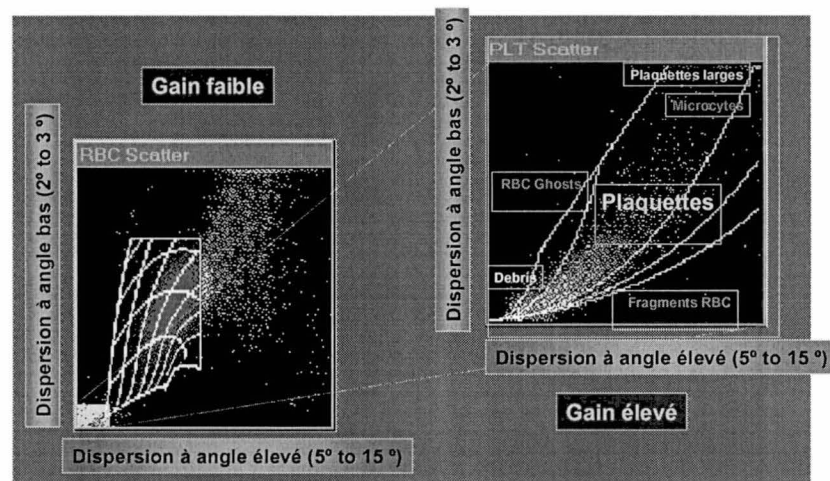


Figure 2. 2 : Analyse des plaquettes intégrée à celle des globules rouges

2. 3. 2 Mesure de l'agrégation des plaquettes par le système PFA-100

Le PFA-100 mesure quantitativement la fonction plaquettaire, en déterminant le temps de formation d'un agrégat plaquettaire. Cet instrument nous permet de mesurer le temps de formation du thrombus plaquettaire, avant la prise médicamenteuse et vingt quatre heures après, chez les patients des groupes abciximab et clopidogrel. Pour chaque patient, nous devons vérifier que le taux de plaquettes est supérieur à 90.000/mm³ et l'hématocrite est supérieur à 30%.

▪ Principe de mesure du PFA-100

800 µl sont nécessaire pour le dosage. Le sang entier prélevé sur citrate de sodium est aspiré par une ouverture de diamètre de 150 µm dans une membrane enduite de collagène et d'épinéphrine (Col/Epi) ou d'adénosine 5'-diphosphate (Col/ADP), et on mesure le temps de fermeture (Closure time). Il représente la mesure du temps requis pour les plaquettes pour s'agréger dans l'échantillon de sang entier et provoquer l'occlusion d'un micropore (MADAN et al., 2002).

2. 4 Déroulement de l'étude

2. 4. 1 Matériel

Cette partie est décrite en annexe (voire annexe I)

2. 4. 2 Procédures d'évaluation de l'activation des plaquettes

2. 4. 2. 1 Préparation des plaquettes

Durant l'étude, afin d'éviter le plus que possible d'induire une activation des plaquettes durant les procédures de collecte de sang, les précautions suivantes ont été prises :

- Prélèvement de sang veineux au pli du coude, par ponction franche.
- Le garrot peu serré moins d'une minute, pour éviter la stase et l'anoxie prolongée qui pourrait induire une libération de thrombine (inducteur de l'activation des plaquettes).
- L'aiguille de prélèvement de calibre 19 est adaptée au pli du coude.
- Rejet des deux premiers millilitres de sang pour éviter les effets de traces de thrombine produites par la ponction veineuse.

- L'échantillon est conservé à température ambiante, et traité dans l'heure qui suit le prélèvement.
- Utilisation de l'anticoagulant universellement admis pour les examens courants en hématologie; l'EDTA. Les paramètres des plaquettes se sont avérés relativement stables dans les échantillons de sang avec EDTA (JACKSON et CARTER,1993). Il faut savoir aussi que l'EDTA n'affecte les plaquettes que bien au delà de l'heure qui suit le prélèvement.

2. 4. 2. 2 Évaluation de l'effet de différents anticoagulants sur l'activation des plaquettes

Étant donné que les plaquettes sanguines sont susceptibles d'être activées facilement lors des procédures expérimentales *in vitro*, on peut confondre cette activation avec une activation plaquettaire *in vivo* (GEORGE et al., 1981). Pour cela, nous avons comparé l'effet des différents anticoagulants sur l'activation des plaquettes *in vitro*. Les objectifs de cette mise au point sont :

- De comparer la capacité de différents anticoagulants (EDTA, citrate de sodium et CTAD (Citric acid, théophylline, adénosine, dipyridamole) à prévenir l'activation des plaquettes *in vitro*, et de déterminer correctement l'activation des plaquettes *in vivo*.
- De comparer l'évaluation de l'activation des plaquettes par deux techniques : la cytométrie de flux et le système automatisé, l'ADVIA 120.

▪ Méthodes

Des échantillons de sang total provenant de volontaires sains sont prélevés dans des tubes avec les différents anticoagulants, CTAD (n=24), citrate de sodium (n=24), et EDTA (n=9). Les échantillons de sang sont mélangés immédiatement à l'anticoagulant. Les deux premiers millilitres de sang sont jetés pour éviter les effets des traces de la thrombine produites pendant le prélèvement. Ces volontaires n'ont pris aucun médicament pouvant interférer avec la fonction plaquettaire pendant les deux semaines précédentes.

▪ Préparation des plaquettes isolées

Des plaquettes ont été isolées du sang entier prélevé dans les anticoagulants EDTA, citrate de sodium et CTAD par centrifugation à 150g pendant quinze minutes à la température ambiante (20°C). Le plasma riche en plaquettes séparé du sang total obtenu, a été centrifugé à 500g durant dix minutes. Le surnageant a été enlevé et au culot plaquettaire on a rajouté 2 ml d'une solution saline PBS à pH 7,4. Les spécimens de sang collectés dans les différents anticoagulants sont analysés par l'ADVIA 120 et la cytométrie de flux.

Les prélèvements de sang total et les plaquettes sanguines isolées sont activés avec de la thrombine humaine (0,2u/ml) pendant cinq minutes, en présence d'un peptide inhibiteur de l'agrégation plaquettaire, le térapeptide gly-pro-arg-pro (GPRP) puis analysés par les deux méthodes, la cytométrie de flux par immunofluorescence et le système automatisé ADVIA 120.

▪ Analyse par cytométrie de flux

Après activation, les échantillons de sang total et les plaquettes isolées sont fixés par le formaldéhyde. Le sang et les plaquettes fixés (5µl), ont été marqués avec différents anticorps : l'anticorps monoclonal IgG conjugué à la phycoérythrine PE (IgG-PE) utilisé comme bruit de fond pour l'analyse, car il se fixe de façon non spécifique sur les plaquettes ; le CD42a anticorps conjugué au fluorochrome FITC (Isothiocyanate de fluorescéine) (CD42a-FITC) (10µl) pour identifier les plaquettes et le CD62P conjugué à la phycoérythrine PE (CD62-PE) (10µl) pour mesurer l'expression de la P-sélectine. Tous les spécimens de sang sont ensuite incubés à la température ambiante pendant quinze minutes dans l'obscurité. Les données quantitatives sont représentées en pourcentage de fluorescence. Le calibrage et la compensation du FACScan (Fluorescence activated cell scanner) ont été exécutés selon les recommandations du fabricant. Cinq mille événements positifs (5000) ont été acquis par le FACScan équipé d'un logiciel d'analyse CellQuest.

- **Analyse par le système hématologique ADVIA 120**

L'instrument de mesure a été normalisé et calibré selon des instructions du système. Les échantillons de sang total prélevés sur anticoagulants EDTA, Citrate de sodium, et CTAD, ont été analysés. Le MPC représente la mesure de l'état basal et de l'activation plaquettaire induite par les agonistes. Les résultats obtenus seront décrits dans le chapitre suivants.

2. 4. 3 Évaluation de l'activation et de l'agrégation plaquettaire chez les patients sous antiplaquettaires

2. 4. 3. 1 Au lit du patient

Grâce à la collaboration du personnel médical et paramédical du service d'hémodynamie, les patients ayant donné leur consentement, subiront des prélèvements sanguins. Les échantillons de sang sont collectés sur des anticoagulants différents : l'EDTA pour la mesure du MPC par l'ADVIA 120 et l'expression de CD62P par la cytométrie de flux. Les paramètres plaquettaires de l'ADVIA 120 sont analysés grâce à la théorie de la dispersion de la lumière pour les particules sphériques et dans l'EDTA, la plaquette conserve une forme sphérique et nous permet d'obtenir la mesure du MPC

(ZELMANOVIC et al., 1998). Le citrate de sodium est utilisé pour la mesure de l'agrégation et un sérum servira à l'analyse des paramètres biochimiques, troponine I et PCR.

Par la suite, le patient reçoit en plus de sa dose quotidienne d'aspirine, une dose charge de 300 mg de clopidogrel pendant l'ICP et 75 mg pendant 28 jours, ou de l'Abciximab à dose charge de 0,25mg/kg pendant l'ICP et 0,125 ug/kg/min en perfusion pendant 12 heures, suivi d'un traitement d'entretien à base de clopidogrel, à la dose de 75 mg par jour. Des prélèvements semblables aux précédents à des temps différents sont faits après prise de la dose charge de clopidogrel ou d'abciximab afin d'étudier le comportement des plaquettes sous l'action de l'antiplaquettaire. On a donc deux groupes de patients : groupe aspirine et clopidogrel ou abciximab.

En résumé, le cadre de l'intervention est limité à des prélèvements sanguins par ponction veineuse aussitôt le consentement du patient obtenu. Des prises de sang sont effectuées avant prise médicamenteuse pour mesurer l'état basal des plaquettes, suivi d'autres prélèvements après administration du médicament afin d'étudier le comportement des plaquettes sous l'effet des inhibiteurs plaquettaires, clopidogrel ou abciximab (figure 2. 3). Selon l'antiplaquettaire administré nous avons donc :

Groupe clopidogrel et aspirine : avant la dose charge de clopidogrel puis deux heures, cinq heures et vingt quatre heures après la dose charge de clopidogrel.

Groupe abciximab et aspirine : avant la dose charge d'abciximab puis dix minutes, deux heures et vingt quatre heures après la dose charge d'abciximab.

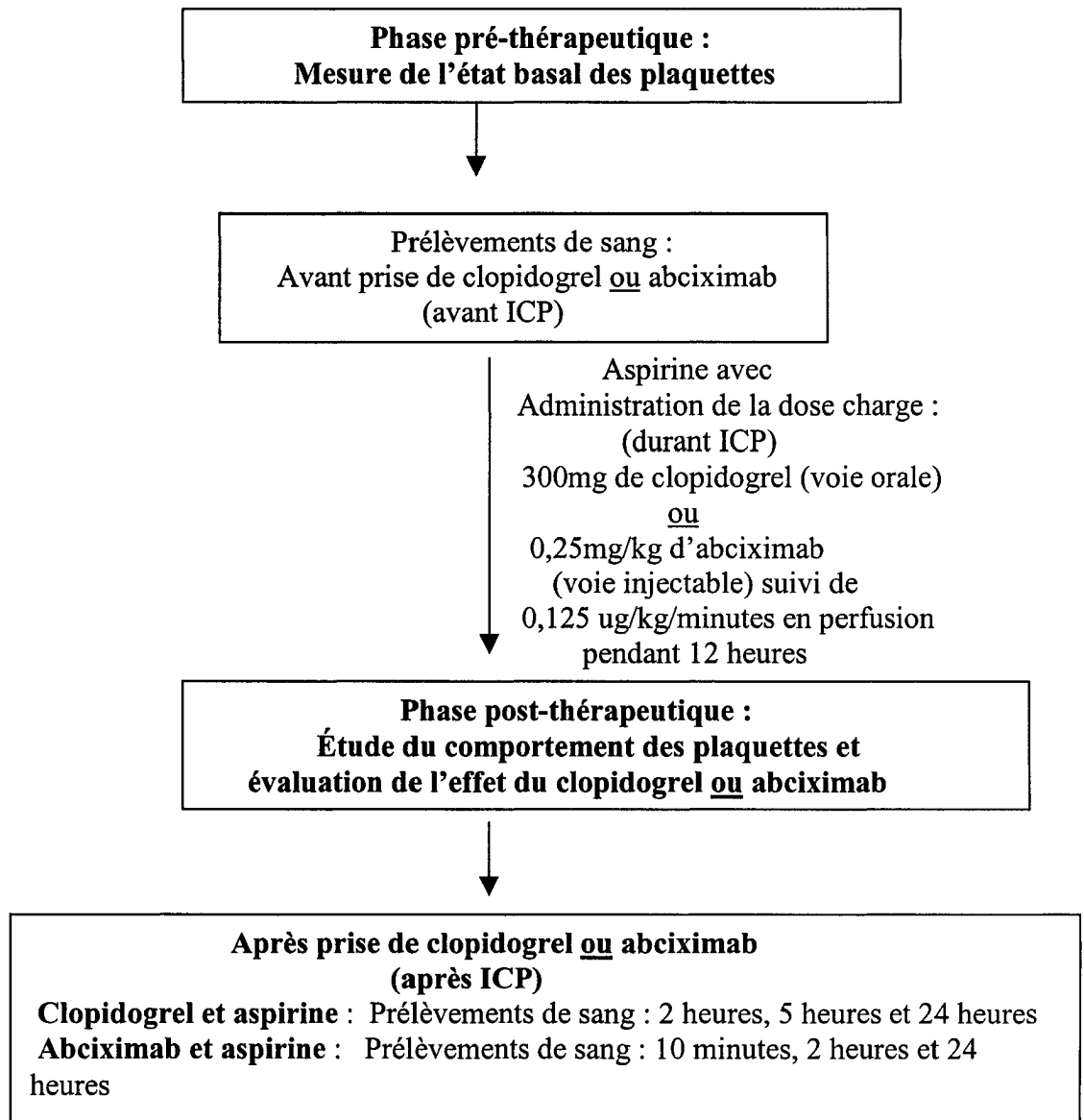


Figure 2. 3 : Les différentes étapes d'évaluation du comportement des plaquettes

2. 4. 3. 2 Le suivi des patients

Les participants sont informés qu'ils seront contactés à nouveau par téléphone, six semaines et trois mois suivant leur congé de l'unité d'hospitalisation. Le but de cette démarche n'est pas d'étudier la valeur pronostique du MPC, mais seulement de vérifier auprès des patients leur état de santé, de noter la survenue d'événements cliniques comme les douleurs thoraciques, une éventuelle réhospitalisation avec angioplastie ou autres complications d'origine coronarienne.

2. 4. 3. 3 Caractéristiques des patients

Des informations sont recueillies directement des dossiers médicaux des patients, à savoir: le diagnostic final, la notion de prise médicamenteuse avant le prélèvement de sang qui précède la dose charge d'antiplaquettaires, les antécédents personnels et familiaux incluant les antécédents coronariens ainsi que la survenue de complications coronariennes durant l'hospitalisation.

2. 4. 3. 4 Au laboratoire

2. 4. 3. 4. 1 Contrôle de qualité de l'ADVIA 120

L'instrument de mesure est standardisé et calibré selon les instructions du fabricant et fait l'objet régulièrement de contrôles de qualité. En effet, quotidiennement, une série d'analyses de sang est effectuée à partir d'un lot de prélèvements de sang normalisé avec des paramètres connus de numération sanguine incluant les paramètres plaquettaires. L'objectif de ce contrôle est de normaliser les paramètres de l'appareil afin d'optimiser la reproductibilité et la validité de nos mesures dans le cadre de nos expériences.

2. 4. 3. 4. 2 Analyse des spécimens de sang du groupe patients sous antiplaquettaires

L'analyse des spécimens est effectuée en différentes étapes :

En prenant soin de laisser agir l'anticoagulant et d'obtenir une stabilité plaquettaire au bout d'une heure de temps. Passé ce délai, on peut analyser les spécimens de sang par la cytométrie de flux par immunofluorescence et l'ADVIA 120.

- Analyse des spécimens de sang par le système automatisé ADVIA 120.

Dans l'heure qui suit la période de stabilisation, pour chaque spécimen de sang des deux groupes clopidogrel et abciximab, prélevés aux heures différentes sont analysés par l'instrument de mesure à deux reprises pour s'assurer de la reproductibilité des résultats. Les paramètres sanguins sont décrits par une formule de numération sanguine, en incluant, plusieurs paramètres plaquettaires dont le taux de plaquettes et le MPC.

- Analyse des spécimens de sang par cytométrie de flux par immunofluorescence

Chaque prélèvement des deux groupes clopidogrel et abciximab subissent les étapes suivantes :

1. Fixation dans l'heure qui suit le prélèvement avec du formaldéhyde
2. Conservation à 4 degrés Celsius des spécimens de sang fixés pendant une heure
3. Double marquage des plaquettes avec les anticorps monoclonaux suivants :
 - Sang fixé (5µl) avec le CD61a-FITC (antiGPIIIa) (10µl) : permet l'identification des plaquettes sanguines
 - Sang fixé (5µl) avec CD62-PE (10µl), reconnaît les plaquettes sanguines activées
4. Manipulation dans l'obscurité à l'abri de la lumière
5. Incubation pendant 15 minutes à température ambiante

6. Acquisition 24 heures après, sur Facscan

De la même manière que citée précédemment, les données quantitatives sont représentées par le pourcentage de fluorescence. Le calibrage et la compensation du FACScan ont été exécutés selon les recommandations du fabricant. Cinq mille événements positifs (5000) ont été acquis par le FACScan équipé du logiciel d'analyse CellQuest.

- Mesure de l'agrégation plaquettaire par le système PFA-100.

Le sang entier prélevé sur citrate de sodium est aspiré à travers un capillaire aux forces de cisaillement élevées et mis en contact avec une membrane dans la cartouche de Collagène/Épinephrine. Les plaquettes adhèrent à la surface de la membrane et s'agrègent entre elles. La formation du thrombus plaquettaire résulte d'une occlusion de l'ouverture et de l'arrêt de l'écoulement de sang. Le taux de plaquettes du patient doit être au-delà de $90\,000 \times 10^9/l$ et l'hématocrite entre 30-35%. On a analysé le sang par le PFA-100 dans un délai de deux heures suivant le prélèvement sanguin.

- Mesure du compte des plaquettes par l'ADVIA 120

L'effet inhibiteur de l'abciximab a été évalué par la mesure du taux de plaquettes par le système hématologique ADVIA 120 et le choix de l'anticoagulant a été porté sur le

citrate de sodium parce que celui-ci n'inhibe pas l'agrégation plaquettaire et permet de suivre l'agrégation *in vitro* des plaquettes en fonction du temps, avant et après la thérapie antiplaquettaire, ce qui n'est pas le cas pour l'EDTA qui affecte beaucoup les plaquettes au delà de l'heure qui suit le prélèvement.

- Analyse des spécimens de sérum

La troponine I et la PCR ont été analysée par analyse immunologique automatisée :

La troponine I : Immunolanalyser (Bayer Diagnostics)

La PCR : Nephelometric technology (BN ProSpec; Dade Behring)

2. 4. 4 Collecte de données

La collecte des paramètres biologiques se fera chaque jour à la fin de l'analyse des prélèvements de sang, dans des tableaux prédéfinis, directement transcrits sur fichier Excel, avec copies de sauvegarde. Les données biologiques sont représentées par les résultats du paramètre MPC, du compte plaquettaire mesuré par l'ADVIA 120, le pourcentage d'évènements positifs de CD62P, mesurés par la cytométrie de flux par immunofluorescence, le taux de troponine I et de PCR, le temps de fermeture du PFA-100. Des analyses probabilistes ainsi que l'utilisation de tableaux et de graphes serviront à

illustrer la dimension des effets mesurés. Cette étape se fera seulement par l'observateur principal pour éviter la confusion dans la collecte des données.

Les données cliniques sont recueillies, vérifiées à partir du dossier médical et informatisé du patient. Celles-ci concernent le diagnostic médical et médication : aspirine, anticoagulants oraux ou autres antiagrégants plaquettaires, et tout agent qui peut interférer avec la fonction plaquettaire avant le prélèvement de sang qui précède la dose charge d'antiplaquettaires, les antécédents personnels et familiaux, surtout coronariens, les complications coronariennes survenant durant l'hospitalisation, six semaines et trois mois après le congé de l'hôpital.

2. 5 Contrôle des biais

2. 5. 1 Biais associés à la sélection des sujets

Le fait que chaque sujet soit son propre témoin, réduit la possibilité d'avoir un biais de sélection, dans la mesure où les critères d'inclusion et d'exclusion sont respectés dans chaque groupe.

2. 5. 2 Biais associés à la mesure des effets

Il s'agit d'un biais lié aux modifications apportées dans la façon de manipuler les instruments de mesures du début à la fin de l'étude. Afin de minimiser ce biais et de s'assurer de la fiabilité de l'instrument de mesure, l'examineur a été formé avant la mise en route du projet, pour uniformiser les procédures d'analyse de laboratoire. De plus les manipulations ont toujours été faites dans des conditions uniformes. Toutes les mesures ont été prises pour renforcer la validité interne de ce dispositif expérimental : bonne calibration de l'appareil, entraînement intense de l'observateur qui sera aussi le manipulateur, utilisation d'un groupe contrôle pour normaliser les valeurs qui serviront de référence pour le projet, rassemblement d'un groupe d'expert pour définir les paramètres du programme de contrôle de qualité de l'ADVIA 120, une identification claire des prélèvements ainsi qu'une manipulation attentive pour éviter les biais de contamination, conservation adéquate, et analyse répétée d'un même prélèvement (deux aspirations successives) afin de s'assurer de la bonne reproductibilité des résultats (fidélité).

2. 5. 3 Biais associés à la généralisation des résultats

La validité externe d'une recherche correspond au degré avec lequel les conclusions d'une étude effectuée sur un échantillon donné, peuvent être appliquées à l'ensemble de la

population. Étant donné que ce projet est une étude préliminaire, il va de soi que les résultats serviront à une étude future plus approfondie.

2. 6 Taille de l'échantillon

Cette étude préliminaire est exploratoire et nous ne pouvons pas faire une estimation de la taille d'échantillon. Nous avons recueillis tous les patients admis à l'unité d'hémodynamie, avec un diagnostic d'AI ou d'IM déjà connus avec l'indication d'ICP et sous thérapie antiplaquettaire, aspirine et clopidogrel ou aspirine et abciximab. Nous voulons mesurer l'activation plaquettaire avant et après prise médicamenteuse. Chaque patient est comparé à lui-même et représente son propre témoin. Le clopidogrel, l'abciximab et l'aspirine sont des antiplaquettaires qui ont un mode d'action différent sur la fonction plaquettaire. Le clopidogrel empêche l'ADP d'induire une activation des plaquettes en l'empêchant d'agir sur son récepteur plaquettaire. L'abciximab empêche le fibrinogène de former un pont avec le récepteur GPIIb/IIIa plaquettaire et induit une inhibition irréversible de l'agrégation plaquettaire. L'aspirine inhibe la production plaquettaire de thromboxane A₂, puissant inducteur de l'agrégation par l'inhibition irréversible de la cyclooxygénase plaquettaire et il est administré en association avec le clopidogrel ou l'abciximab. Pour cela, afin de déterminer l'effet propre de chaque

antiplaquettaire, nous avons défini deux groupes de patients (clopidogrel et aspirine; abciximab et aspirine) et ce choix a limité le nombre de patients "abciximab" recrutés, car la majorité des patients reçoivent du clopidogrel. D'autre part, tous les cardiologues qui prennent en charge les patients en salle d'hémodynamie n'adoptent pas un protocole médicamenteux uniforme chez ces patients, ce qui rend difficile le recrutement de patients sous prescription de l'un ou l'autre des antiplaquettaires, ce qui a limité encore une fois notre taille d'échantillon pour les deux groupes de patients clopidogrel et abciximab.

2. 7 Analyse des données

Les caractéristiques de la population étudiée sont représentées en pourcentage pour la variable catégorique (sexe) et à l'aide de moyenne et écart type pour la variable continue (âge). Le test de student (t paired) est utilisé pour comparer l'activation des plaquettes *in vivo*, spontanée ou induite par la thrombine et pour comparer l'activation plaquettaire avant (état basal) et après administration de la thérapie antiplaquettaire, à savoir clopidogrel ou abciximab. Les valeurs de $p < 0,05$ sont considérées comme significatives et nos données ont été traitées par le logiciel statview. Le test du Khi-deux a été utilisé pour déterminer la relation possible entre les paramètres d'activation plaquettaire et la PCR. Enfin, pour comparer l'évaluation de l'activation des plaquettes par la cytométrie de

flux par immunofluorescence avec le système automatisé l'ADVIA 120, ont été utilisées des statistiques de corrélation, pour quantifier l'intensité de l'association entre les deux variables représentées par les deux paramètres plaquettaire le MPC et le pourcentage de CD62P.

2. 8 Considérations éthiques

Tous les échantillons de sang ont été codés et le nom des sujets ne sera jamais dévoilé. Les renseignements consignés dans les dossiers demeurent strictement confidentiels conformément aux dispositions de la loi sur l'accès à l'information. La participation du patient est totalement volontaire et il est libre de s'en retirer s'il le désire, à tout moment. Cette recherche a été approuvée par le comité d'éthique du centre hospitalier universitaire de Sherbrooke. Le formulaire de consentement (voire annexe) est présenté au patient au moment opportun ; il dispose d'une copie originale signée et conservée soigneusement au département, et d'une copie qu'il peut garder avec lui. La confidentialité a été toujours respectée.

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

Les résultats de l'étude portant sur l'évaluation de l'activation des plaquettes par une nouvelle mesure d'activation plaquettaire sont présentés dans ce chapitre. Tout d'abord, nous exposerons les résultats obtenus sur la comparaison de l'effet des différents anticoagulants sur l'activation des plaquettes *in vitro*. Par la suite, les résultats obtenus chez les patients coronariens, sous forme de tableaux, issus d'analyses descriptives sont décrits. Ils regroupent les caractéristiques physiques et cliniques de l'échantillon. Diverses analyses statistiques inférentielles sont effectuées dans le but de montrer si le MPC reflète bien l'état d'activation plaquettaire par la relation entre ce paramètre qui est mesuré par le système automatisé l'ADVIA 120 et le pourcentage de CD62P mesurée par la cytométrie de flux par immunofluorescence. L'association entre le MPC et les deux autres paramètres biochimiques utilisés en pratique routinière la troponine I et la PCR est également établie.

3. 1 Évaluation de l'activation plaquettaire sous l'effet de différents anticoagulants, citrate de sodium, EDTA et CTAD

3. 1. 1 Mesure de l'activation plaquettaire dans le sang total

Les changements des valeurs du MPC déterminés par le système ADVIA 120 avec et sans addition de 0.2 U/ml de thrombine sur le sang total prélevé sur trois

anticoagulants différents sont présentés en moyenne \pm écart-type, pour le citrate de sodium (n=24), l'EDTA, (n=9) et CTAD (n=24). Sans addition de thrombine, les valeurs du MPC sont 25.7 ± 0.9 g/dl, 27.9 ± 0.9 /dl et 24.8 ± 1.2 g/dl dans les échantillons de sang total avec les anticoagulants suivants : citrate de sodium, EDTA et CTAD respectivement. L'addition de thrombine induit un changement significatif dans les tubes contenant le citrate de sodium et l'EDTA, les valeurs du MPC diminuent à 21.9 ± 1.9 g/dl ($p < 0.0001$) et 23.2 ± 0.9 g/dl ($p < 0.0001$) respectivement. Par contre, la thrombine n'a aucun effet sur les valeurs du MPC : 24.9 ± 1.1 g/dl ($p = 0.777$) mesurées dans les tubes contenant l'anticoagulant CTAD (tableau 3. 1) (figure 3. 1).

L'évaluation de l'activation des plaquettes par la cytométrie de flux par immunofluorescence montre des résultats similaires. Le pourcentage de CD62P est significativement élevé de 9.2 ± 7.0 à 55.5 ± 23.1 % ($p < 0.0001$) et de 1.9 ± 1.7 à 64.6 ± 12.4 % ($p < 0.0001$), après addition de 0.2 U/ml de thrombine dans le sang total avec citrate de sodium et l'EDTA respectivement. Cependant, dans les tubes de sang total avec CTAD, les changements sont non significatifs (3.1 ± 12.0 à 3.8 ± 1.8 % ; $p = 0.233$) (tableau 3. 1) (figure 3. 2).

La corrélation entre le pourcentage de CD62P et l'état d'activation plaquettaire mesurée par le MPC a été déterminée (figure 3. 3). L'augmentation thrombine-dépendante, du pourcentage de CD62P des plaquettes avec le citrate de sodium corrèle bien avec la diminution des valeurs du MPC ($r = - 0.87$; $P < 0.0001$).

	Citrate de sodium (n=24)			CTAD (n=24)			EDTA (n=9)		
	Basal	Thrombine	p	Basal	Thrombine	p	Basal	Thrombine	p
MPC (g/dl)	25.7±0.9	21.9±1.9	<0.0001	24.8±1.2	24.9±1.1	ns	27.9±0.9	23.2±0.9	<0.0001
%CD 62P (fluorescence)	9.2±7.0	55.5±23.1	<0.0001	3.1±2.0	3.8±1.8	ns	1.9±1.7	64.6±12.4	<0.0001

Tableau 3. 1 : Effet de la thrombine sur l'activation des plaquettes, mesuré dans le sang total avec citrate de sodium, CTAD et EDTA, exprimé par le MPC mesuré par le système automatisé ADVIA 120 et le pourcentage de CD62P mesuré par la cytométrie de flux par immunofluorescence (les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type).

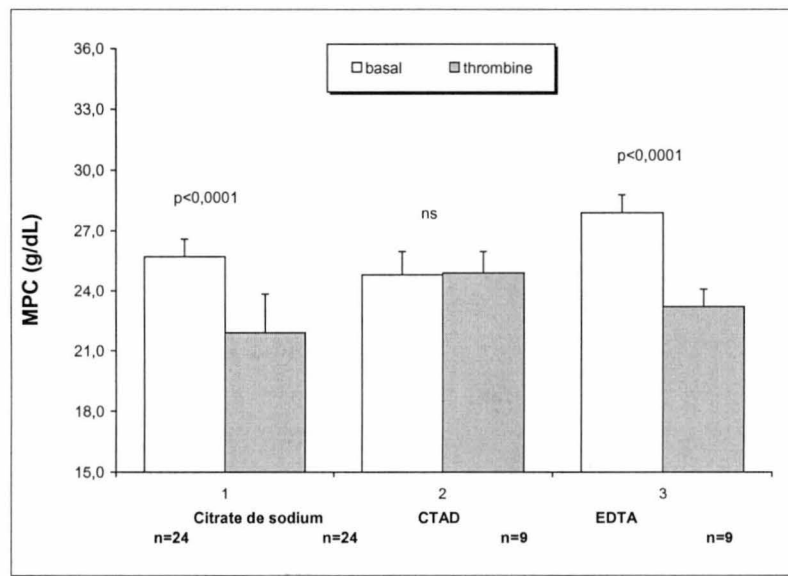


Figure 3. 1 : Effet de la thrombine sur l'activation des plaquettes, mesuré dans le sang total avec citrate de sodium, CTAD et EDTA, exprimé par le MPC, mesuré par le système automatisé ADVIA 120

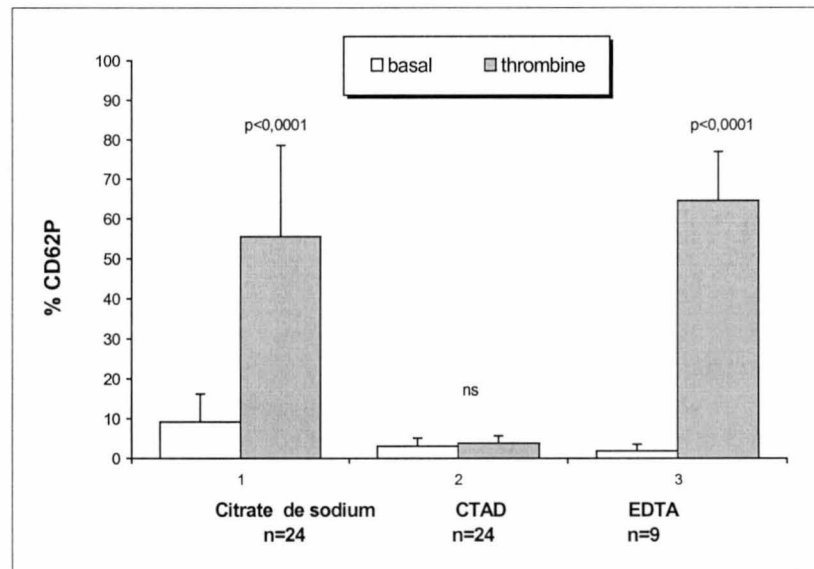


Figure 3. 2 : Effet de la thrombine sur l'activation des plaquettes, mesuré dans le sang total avec citrate de sodium, CTAD et EDTA, exprimé par le pourcentage de CD62P, mesuré par la cytométrie de flux par immunofluorescence.

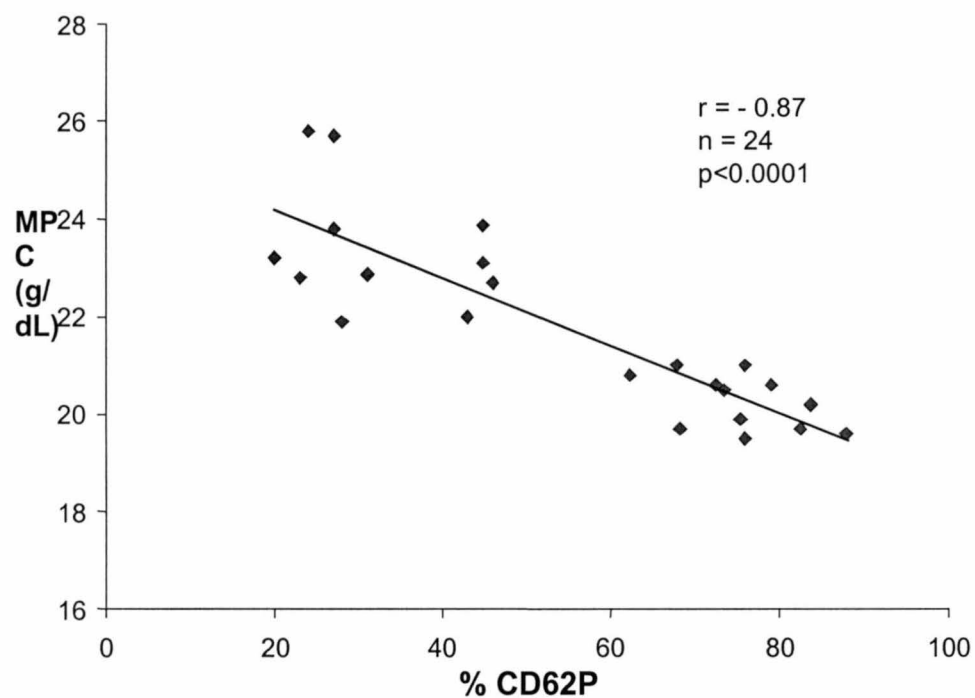


Figure 3. 3 : Corrélation entre les paramètres plaquettaires, MPC mesuré par l'ADVIA 120 et le pourcentage de CD62P, mesuré par la cytométrie de flux par immunofluorescence sur citrate de sodium.

3. 1. 2 Mesure de l'activation sur les plaquettes isolées

L'effet de la thrombine sur les plaquettes isolées du sang total prélevé sur CTAD est évalué afin de déterminer si l'effet inhibiteur du CTAD est réversible. Les plaquettes sanguines sont isolées à partir du sang total prélevé dans des tubes avec CTAD et EDTA et stimulées avec de la thrombine. Les données sont présentées en moyenne \pm écart-type pour les anticoagulants suivants : CTAD et EDTA sur le sang total. Les résultats montrent les valeurs du MPC sont significativement diminuées de 26.3 ± 2.4 à 23.6 ± 1.1 g/dl ($p < 0.005$) dans les tubes à CTAD. Les plaquettes isolées dans les tubes à EDTA montrent aussi une diminution du MPC significative de 26.5 ± 2.1 à 22.8 ± 1.6 ($p < 0.001$) (tableau 3. 2) (figure 3. 4).

L'analyse par cytométrie de flux révèle des résultats similaires. Les plaquettes isolées montrent un pourcentage élevé de CD62P de 0.8 ± 0.8 à 70.6 ± 11.7 % ($p < 0.0001$) et de 32.3 ± 7.1 à 64.7 ± 11.2 % ($p < 0.0001$) dans les tubes avec CTAD et EDTA respectivement. L'étude des plaquettes isolées a montré une activation induite par la thrombine indiquant que les plaquettes sur CTAD restent fonctionnelles puisque une fois isolées du sang total, elles deviennent activables (tableau 3. 2) (figure 3. 5).

	CTAD (n=9)			EDTA (n=9)		
	Basal	Thrombine	p	Basal	Thrombine	p
MPC (g/dl)	26.3±2.4	23.6±1.1	<0.005	26.5±2.1	22.8±1.6	<0.001
%CD62P (fluorescence)	0.8±0.8	70.6±11.7	<0.0001	32.3±7.1	64.7±11.2	<0.0001

Tableau 3. 2 : Effet de la thrombine sur l'activation des plaquettes isolées avec CTAD et EDTA, exprimé par le MPC, mesuré par le système automatisé ADVIA 120 et par le pourcentage de CD62P, mesuré par la cytométrie de flux par immunofluorescence (les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type).

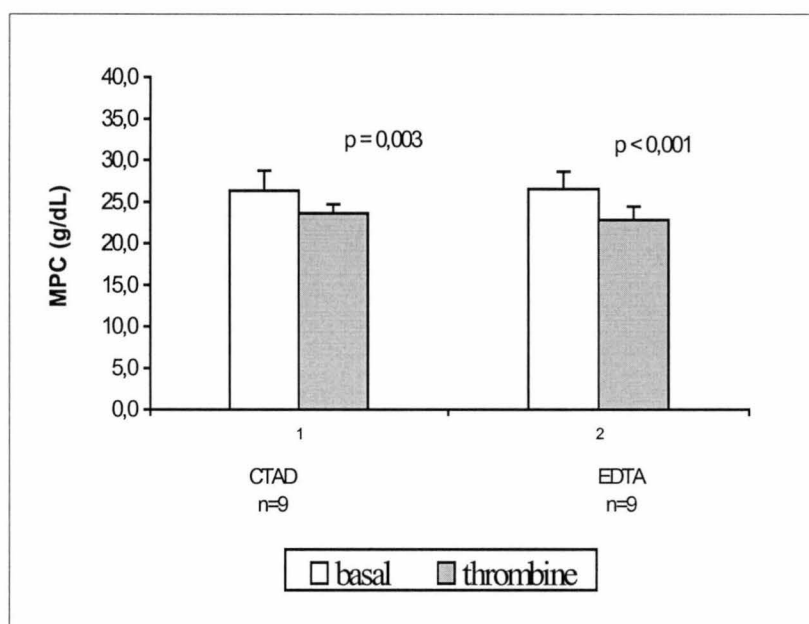


Figure 3. 4 : Effet de la thrombine sur l'activation des plaquettes isolées avec CTAD et EDTA, exprimé par le MPC mesuré par le système hématologique ADVIA 120.

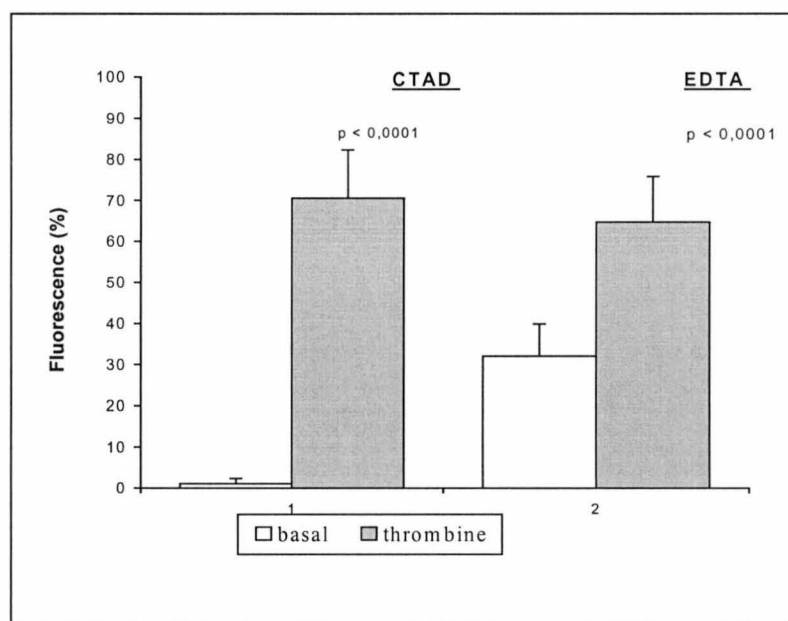


Figure 3. 5 : Effet de la thrombine sur l'activation des plaquettes isolées avec CTAD et EDTA, exprimé par le pourcentage de CD62P, mesuré par la cytométrie de flux par immunofluorescence.

3. 2 Évaluation de l'activation et l'agrégation plaquettaire chez les patients sous antiplaquettaires

3. 2. 1 La participation des sujets

Au total, 48 patients coronariens remplissant les critères de sélection ont été sollicités pour participer à l'étude et 44, âgés de 39 à 89 ans ont accepté de participer (figure 3.6). Selon l'antiplaquettaire administré sous avis médical, on retrouve dans notre étude, deux groupes de patients, le groupe sous aspirine et clopidogrel ou abciximab. Sur les 32 patients admissibles dans le groupe clopidogrel, 29 ont accepté de participer et sur les 16 patients admissibles dans le groupe abciximab, 15 ont accepté de participer. Dans les deux groupes, les raisons du refus de participation sont dans la plus part des cas liés aux prélèvements effectués à des heures différentes.

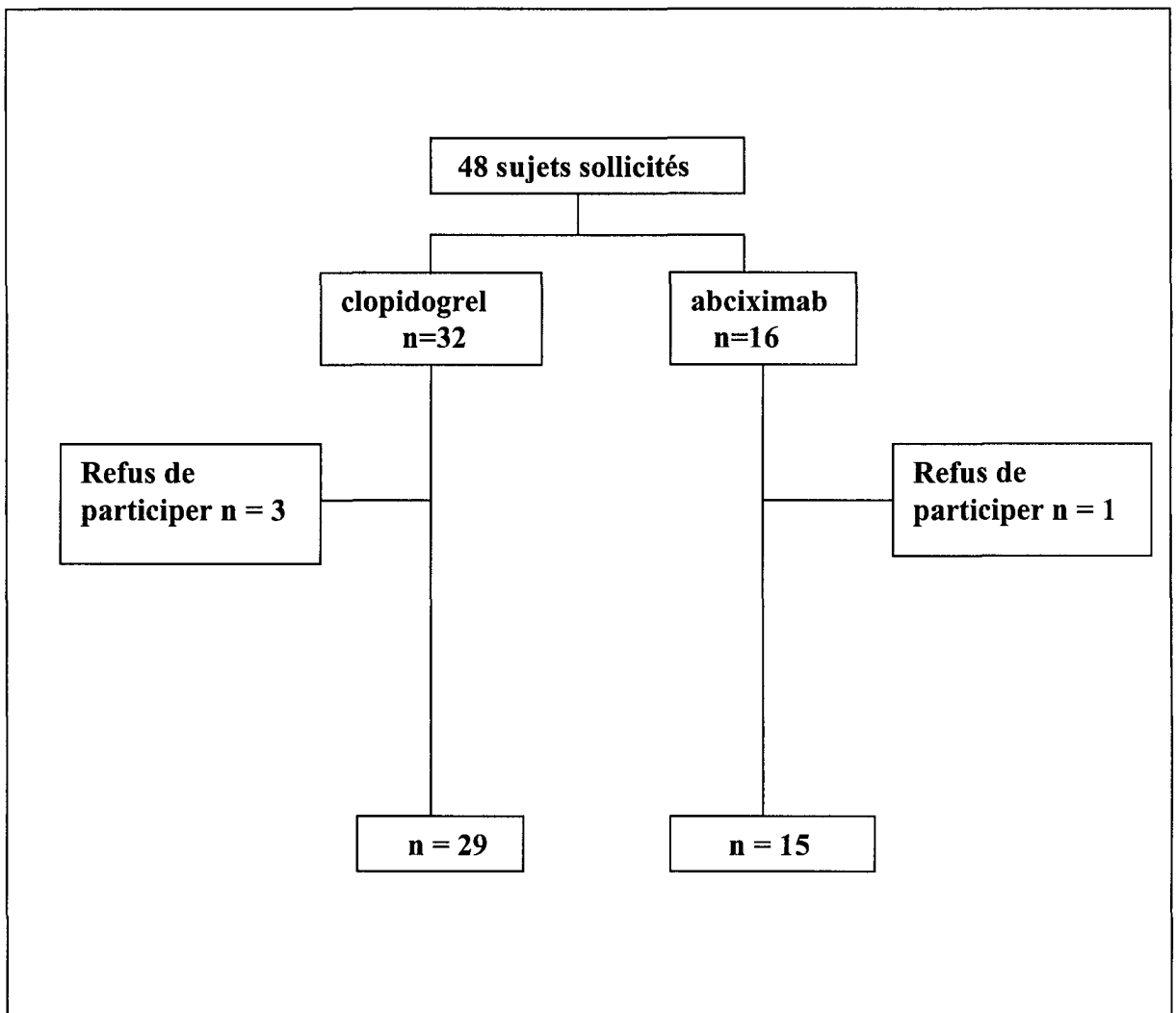


Figure 3. 6 : Participation des sujets à l'étude

3. 2. 2 Les caractéristiques des participants

3. 2. 2. 1 L'âge et le sexe

Les caractéristiques de la population étudiée sont présentées au tableau 3.3. Ainsi l'étude a été réalisée auprès de deux groupes de patients dont la moyenne d'âge est de 60 ans pour le groupe clopidogrel et de 59 ans pour le groupe abciximab. La majorité des patients coronariens participants sont des hommes ; ils représentent 72% des sujets recrutés dans le groupe clopidogrel et 86% des participants dans le groupe abciximab.

3. 2. 2. 2 Les caractéristiques cliniques

Nous avons considéré certaines caractéristiques cliniques importantes, pour déterminer des sous-groupes de patients :

- Le diagnostic à l'admission de SCA
- La médication, incluant les antiplaquettaires et anticoagulants
- Les antécédents personnels et familiaux d'évènements coronariens
- Les évènements cardiaques durant l'hospitalisation
- La présence ou l'absence de complications coronarienne, six semaines et trois mois après la sortie du patient de l'hôpital.

3. 2. 2. 2. 1 Le diagnostic

Parmi les patients qui sont sous clopidogrel, 79% ont un diagnostic d'AI et 21% d'IM. Pour ceux qui sont sous abciximab, 53% ont un diagnostic d'AI, 40% d'IM et 7% de MCS (maladie coronarienne stable). La maladie coronarienne stable est posée comme diagnostic chez certains patients après avis du cardiologue, sans pouvoir spécifier s'il s'agissait d'une d'AI ou d'un IM. Par conséquent, nous ne pouvions pas les classer ni dans le groupe des AI ni dans le groupe des IM. Un seul cas de MCS s'est présenté dans le groupe abciximab.

3. 2. 2. 2. 2 Médicaments interférant avec la fonction des plaquettes

Nous avons recherché la notion de prise médicamenteuse qui pourrait interférer avec la fonction plaquettaire, et modifier nos résultats. En effet, la majorité des patients des deux groupes recrutés dans l'étude ont pris de l'aspirine soit 96% dans le groupe clopidogrel et 86% dans le groupe abciximab, avant d'entreprendre les prélèvements sanguins, pour la simple raison que ces patients ont des antécédents personnels de SCA, soit d'AI soit d'IM, de MCS ou qu'ils soient connus hypertendus. Il est important d'en tenir compte car l'aspirine interfère avec la fonction plaquettaire par inhibition de la production plaquettaire de thromboxane A₂. D'autre part, il faut savoir que l'aspirine est administrée en faible dose d'entretien durant une période

indéfinie et des doses répétées d'aspirine produisent un effet cumulatif sur la fonction plaquettaire en bloquant l'agrégation de 20% à 30%, ce qui pourrait interférer avec nos résultats. 55% des patients du groupe clopidogrel et 66% du groupe abciximab ont pris des anticoagulants donnés soit par voie veineuse comme l'héparine et autres anticoagulants par voie orale. Deux patients appartenant au groupe clopidogrel, et quatre du groupe abciximab, n'ont aucune notion de prise médicamenteuse à base d'antiplaquettaires avant les prélèvements sanguins.

3. 2. 2. 2. 3 Les antécédents personnels et familiaux

Nous avons recherché dans les antécédents personnels et familiaux, la notion d'évènements coronariens et surtout les facteurs de risque qui peuvent classer les patients recrutés "à risque" et augmentent leurs chances de développer des complications coronariennes. D'autre part, tous les sujets ont des antécédents d'évènements coronariens, soit d'AI, d'IM ou de façon moins spécifique, de MCS. 4 sujets, dans le groupe clopidogrel ont eu un premier événement coronarien et 6 sujets dans le groupe abciximab. Cependant, on retrouve chez ces patients la notion de facteurs de risques : tabac, dyslipidémie, hypertension artérielle, antécédents familiaux de SCA ou diabète. Un patient appartenant au groupe clopidogrel n'avait aucun antécédent personnel ni familial d'évènements coronariens. Dans le groupe clopidogrel, 8 patients ont subi une ICP et un patient, un pontage coronarien. Dans le groupe abciximab, 4 patients ont subi également une ICP et trois un pontage coronarien. Le tableau 3.3 résume les caractéristiques physiques et cliniques des participants.

Tableau 3. 3 :Caractéristiques physiques et cliniques des participants

	Clopidogrel n = 29	Abciximab n = 15
Sexe	M: 21 (72) ; F: 8 (27)	M: 13 (86); F: 2 (13)
Âge	60 ± 13	59 ± 10
Diagnostic		
AI	23 (79)	8 (53)
IM	6 (21)	6 (40)
MCS	0	1 (7)
Médication reçue avant		
Aspirine ou Entrophen	28 (96)	13 (86)
Anticoagulants	16 (55)	10 (66)
Antécédents médicaux		
Hypertention artérielle	13 (45)	8 (53)
Diabète	3	1
Notion de tabagisme	13 (45)	5 (33)
Aucun	1	0
Antécédents d'ICP	8 (28)	4 (27)
Antécédents de PAC	1	3
Valeurs n (%)		

3. 2. 3 Mesure de l'activation plaquettaire

L'administration de la dose charge de l'antiplaquettaire, soit 300 mg de clopidogrel par voie orale ou 0,25 mg par kg de poids corporel d'abciximab par voie intraveineuse, se fait juste avant le début de l'intervention de dilatation coronarienne ou durant la procédure. Dans tous les cas et dans la mesure du possible, il est important que les prélèvements sanguins soient faits avant la prise d'antiplaquettaires, clopidogrel ou abciximab, afin d'évaluer l'état de la fonction des plaquettes par les deux paramètres, MPC mesuré par le système hématologique l'ADVIA 120 et le pourcentage de CD62P mesurée par la cytométrie de flux par immunofluorescence et exprimée en pourcentage de fluorescence. Ces mesures, correspondent à l'état basal des plaquettes sanguines et déterminent l'absence ou la présence de plaquettes activées avant l'utilisation des inhibiteurs de la fonction des plaquettes.

Une autre série de prélèvements est effectuée après la prise médicamenteuse, à des temps définis pour chaque groupe sur une période de vingt quatre heures, afin d'étudier le comportement des plaquettes. On effectue ces prélèvements deux heures, cinq heures et vingt quatre heures après, dans le groupe clopidogrel ; en notant que l'effet inhibiteur du clopidogrel est obtenu entre deux heures et cinq heures pour une dose charge de 300 mg. Dans le groupe abciximab, les prélèvements sont entrepris dix minutes après la perfusion intraveineuse, puis deux heures et vingt quatre heures après ; en notant que l'effet inhibiteur de l'abciximab est maximal au bout de dix

minutes. Le test de student (t-paired) a été utilisé pour comparer dans chaque groupe l'activation plaquettaire avant et après prise de clopidogrel ou d'abciximab, pour ce faire, le seuil de signification a été établi à $p < 0,05$.

La sélection des patients activés s'est faite à partir des critères suivants :

- Tout d'abord, en se basant sur une valeur de référence du MPC qui est la moyenne des résultats obtenus à partir de sujets sains ne présentant aucuns facteurs de risques coronariens (MPC : 27.2 ± 1.3 g/dl) (BRUMMIT et al., 2000).
- Cependant, ce seuil de référence peut-être différent dans une population de coronariens et les patients coronariens de l'étude sont leur propre contrôle. Les mesures de MPC ainsi que le pourcentage de CD62P sont comparées avant et après prise médicamenteuses et nous avons inclus tout les patients qui présentent un changement des valeurs du MPC dans le groupe des patients activés. La valeur du MPC a été interprétée aussi en fonction de la valeur positive du pourcentage de CD62P.

Les tableaux suivants représentent les résultats obtenus pour tous les patients clopidogrel et tous les patients abciximab.

Temps de mesure	Avant	2 heures	5 heures	24 heures après
MPC (g/dl) Valeur p	27.8 ± 2.3	28.4 ± 1.4 0.106	28.9 ± 0.9 0.005	28.7 ± 1.0 0.016
CD62P (%) Valeur p	12.35 ± 21.64	4.95 ± 12.86 0.276	1.67 ± 4.01 0.021	2.59 ± 7.14 0.030

Tableau 3. 4 : Groupe clopidogrel (n=29), mesure des paramètres plaquettaires MPC par l'ADVIA 120 et le pourcentage de CD62P par la cytométrie de flux par immunofluorescence avant et après administration de clopidogrel. Les données sont présentées en moyenne ± écart-type pour le MPC et le pourcentage de CD62P.

Nous avons constaté après analyse des données obtenues par la cytométrie de flux que les patients répondent au clopidogrel, par une diminution après deux heures, du pourcentage de CD62P exprimée en pourcentage de fluorescence, significative seulement cinq heures après et vingt quatre heures après ($p < 0.05$; respectivement). Il y a une élévation concomitante des valeurs du MPC mesurées par l'ADVIA 120, de façon aussi significative, cinq heures et vingt quatre heures après ($p < 0.05$; respectivement) (tableau 3. 4).

Temps de mesure	Avant	10 minutes	2 heures	24 heures après
MPC (g/dl) Valeur p	28 ± 1.3	27.9 ± 1.1 0.835	28.4 ± 0.9 0.423	28.4 ± 0.9 0.163
CD62P (%) Valeur p	9.98 ± 15.81	————	3.22 ± 7.41 0.208	0.93 ± 1.23 0.046

Tableau 3. 5 : Groupe abciximab (n=15), mesure des paramètres plaquettaires MPC par l'ADVIA 120 et le pourcentage de CD62P par la cytométrie de flux par immunofluorescence avant et après administration d'abciximab. Les données sont présentées en moyenne ± écart-type pour le MPC et le pourcentage de CD62P.

De la même manière pour le groupe abciximab, les patients répondent également par une diminution du pourcentage de CD62P exprimée en pourcentage de fluorescence, deux heures après mais de façon significative seulement vingt quatre heures après ($p < 0.05$) (tableau 3. 5). Les valeurs du pourcentage de CD62P au bout de dix minutes, n'ont pu être obtenues, pour des raisons techniques. Pour les valeurs du MPC, une élévation modeste est constatée deux heures et vingt quatre heures après, mais non significative.

Par contre, si on analyse individuellement les résultats, en tenant compte des valeurs du MPC avant traitement, nous déterminons deux groupes de patients, patients activés versus non activés. En effet, 11 patients du groupe clopidogrel et 5 du groupe

abciximab ont une activation des plaquettes avant traitement, 18 patients du groupe clopidogrel et 10 du groupe abciximab n'ont pas d'activation plaquettaire avant traitement. Donc, si l'on regroupe tous les patients des groupes clopidogrel et abciximab avant traitement, on retrouve deux types de patients :

- Groupe de 16 patients (11 clopidogrel et 5 abciximab) avec présence d'activation des plaquettes avant traitement
- Groupe de 28 patients (18 clopidogrel et 10 abciximab) avec absence d'activation des plaquettes avant traitement

Cependant, on doit noter que parmi les patients sans activation plaquettaire avant traitement, la majorité n'ont aucun changement significatif après prise d'antiplaquettaires, mise à part quelques 7 patients qui présentent une activation des plaquettes après prise d'antiplaquettaires et cela malgré l'effet inhibiteur du clopidogrel ou de l'abciximab. Il s'agit de 3 patients clopidogrel et 4 patients abciximab. Les tableaux suivants regroupent les résultats obtenus pour chaque type de patients (moyenne \pm écart-type), suivi des figures représentatives (moyennes \pm SEM) (SEM : Error to Standard Mean) des valeurs respectives du MPC et du pourcentage de CD62P et les réponses individuelles de chaque patient à l'antiplaquettaire administré.

3. 2. 3. 1 Résultats du groupe clopidogrel

Temps de mesure	Avant	2 heures	5 heures	24 heures après
MPC (g/dl) Valeur p	25.7± 2.5	28 ± 1.6 0.004	28.8 ± 1.1 0.000	28.4 ± 1.0 0.001
CD62P (%) Valeur p	28.13 ± 26.36	2.69 ± 3.84 0.006	0.67 ± 0.78 0.005	2.37 ± 2.69 0.005

Tableau 3. 6 : Groupe de patients clopidogrel (n=11), avec plaquettes activées avant traitement, mesure des paramètres plaquettaires MPC par l'ADVIA 120 et le pourcentage de CD62P par la cytométrie de flux par immunofluorescence avant et après administration de clopidogrel. Les données sont présentées en moyenne ± écart-type pour le MPC et le pourcentage de CD62P.

Dans ce groupe de 11 patients, les résultats montrent une augmentation du pourcentage de CD62P avant traitement et une diminution significative du pourcentage de CD62P, exprimée en pourcentage de fluorescence, deux heures, cinq heures et vingt quatre heures après traitement, ($p < 0.05$; respectivement). De même pour le MPC, l'effet du clopidogrel est déterminée par une élévation significative des valeurs, deux heures, cinq heures après et vingt quatre après ($p < 0.05$; respectivement) (tableau 3. 6) (figure 3. 7a et 3. 7b). Les figures suivantes représentent les moyennes obtenues des valeurs des paramètres plaquettaires MPC et du pourcentage de CD62P pour chaque sous-groupes et les réponses individuelles de chaque patient à l'antiplaquettaire administré.

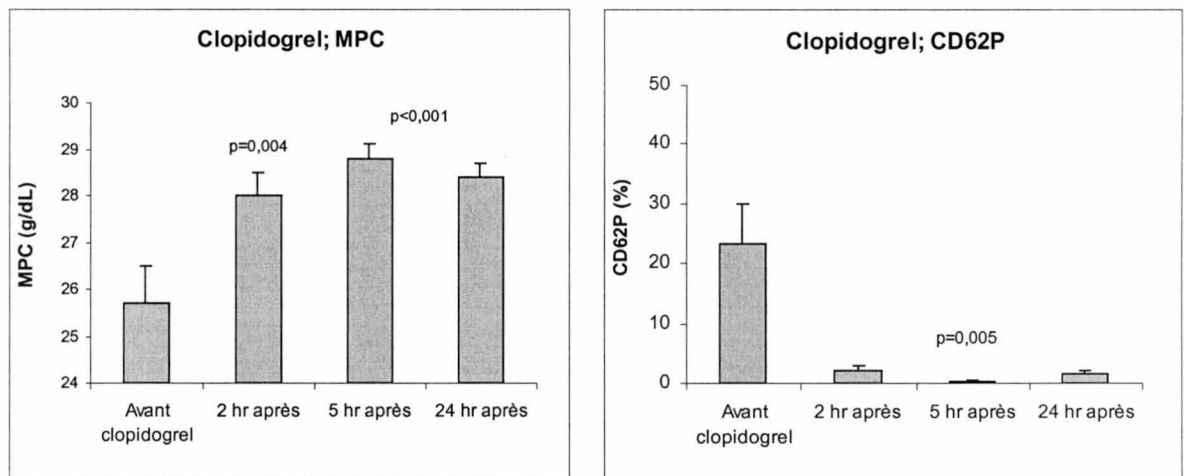


Figure 3.7a : Groupe de patients avec activation plaquettaire avant traitement et effet inhibiteur du clopidogrel, n=11. Les valeurs du MPC et de CD62P-PE sont exprimées en moyenne \pm SEM.

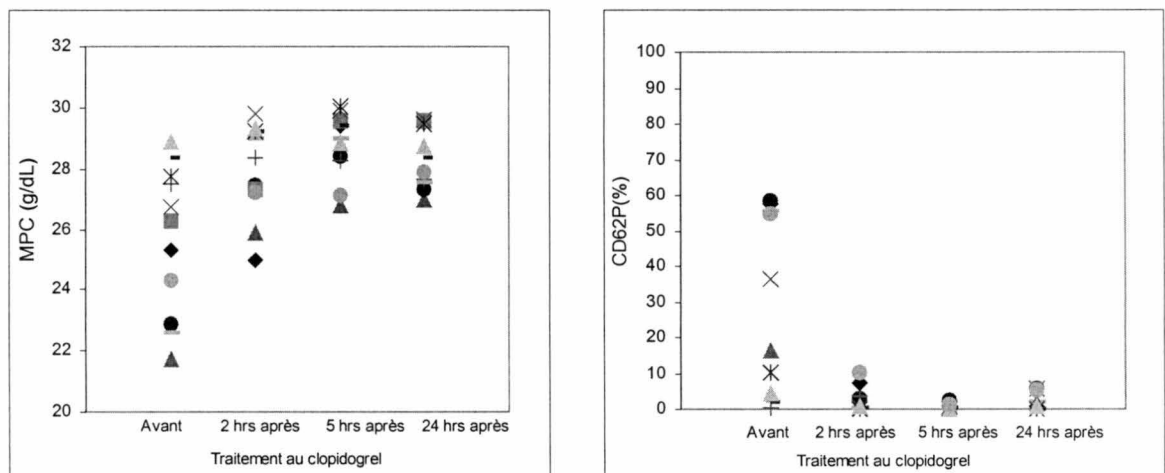


Figure 3.7b : Réponse individuelle de l'effet inhibiteur du clopidogrel sur l'activation plaquettaire, observé chez n=11 patients.

Temps de mesure	Avant	2 heures	5 heures	24 heures après
MPC (g/dl) Valeur p	29.1 ± 0.8	29.0 ± 0.8 0.258	29.0 ± 0.8 0.860	29.1 ± 0.8 0.933
CD62P (%) Valeur p	0.29 ± 0.28	1.05 ± 3 0.360	0.38 ± 0.41 0.541	0.43 ± 0.49 0.407

Tableau 3. 7 : Groupe de patients clopidogrel (n=15) avec plaquettes non activées avant traitement, mesure des paramètres plaquettaires MPC par l'ADVIA 120 et le pourcentage de CD62P par la cytométrie de flux par immunofluorescence avant et après administration de clopidogrel. Les données sont présentées en moyenne ± écart-type pour le MPC et le pourcentage de CD62P.

Dans ce groupe de 15 patients, où on ne retrouve pas d'activation plaquettaire avant traitement, les valeurs du pourcentage de CD62P et du MPC ne présentent aucun changement significatif et ne sont pas modifiées par la thérapie antiplaquettaire (tableau 3. 7) (figure 3. 8a et 3. 8b) .

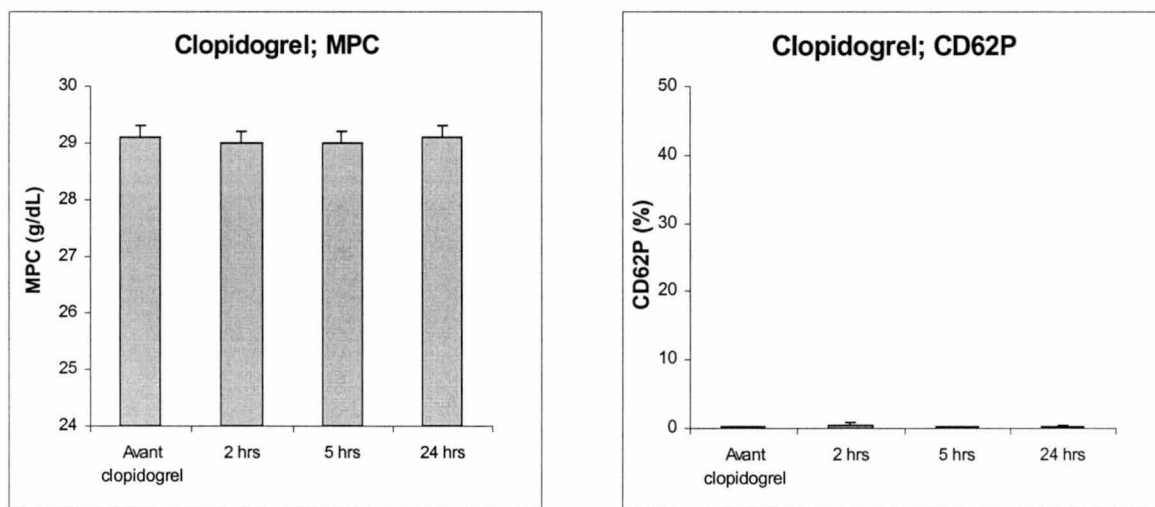


Figure 3.8a : Groupe de patients clopidogrel sans activation des plaquettes avant et après traitement, n=15. Les valeurs du MPC et de CD62P-PE sont exprimées en moyenne \pm SEM.

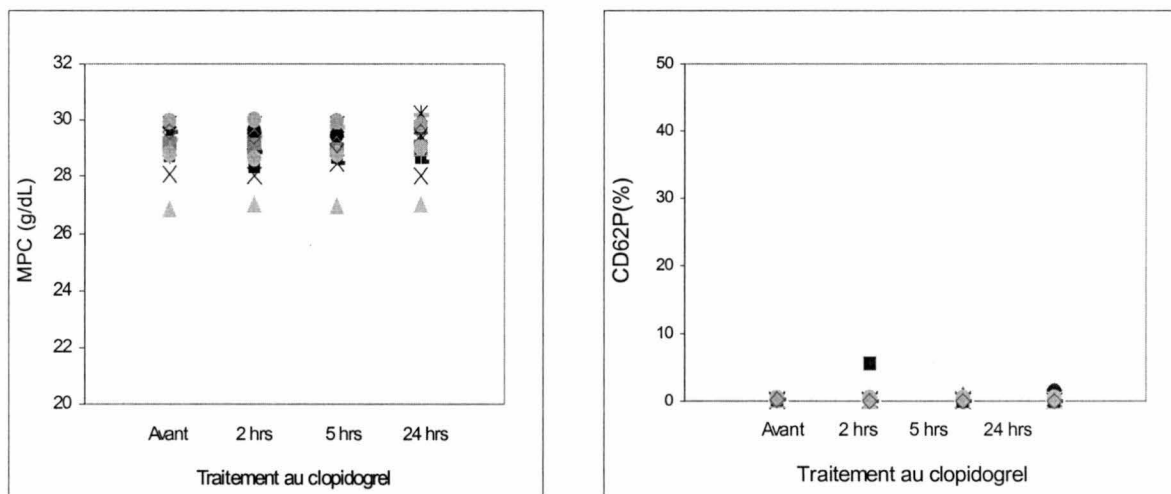


Figure 3.8b : Patients du groupe de clopidogrel (n=15), sans activation plaquettaire avant et après traitement au clopidogrel.

On note par contre, chez 3 patients, l'absence d'activation des plaquettes avant traitement, suivi d'une activation des plaquettes malgré l'effet inhibiteur du clopidogrel qui se manifeste par une élévation du pourcentage de CD62P non significative ($p= 0.362$) au bout de deux heures et vingt quatre heures après ($p= 0.521$). Parallèlement les valeurs du MPC se traduisent par une diminution non significative deux heures ($p= 0.258$) et vingt quatre heures après ($p= 0.532$). La figure suivante représente la réponse individuelle des 3 patients avec des plaquettes activées malgré le traitement au clopidogrel (figure 3. 9).

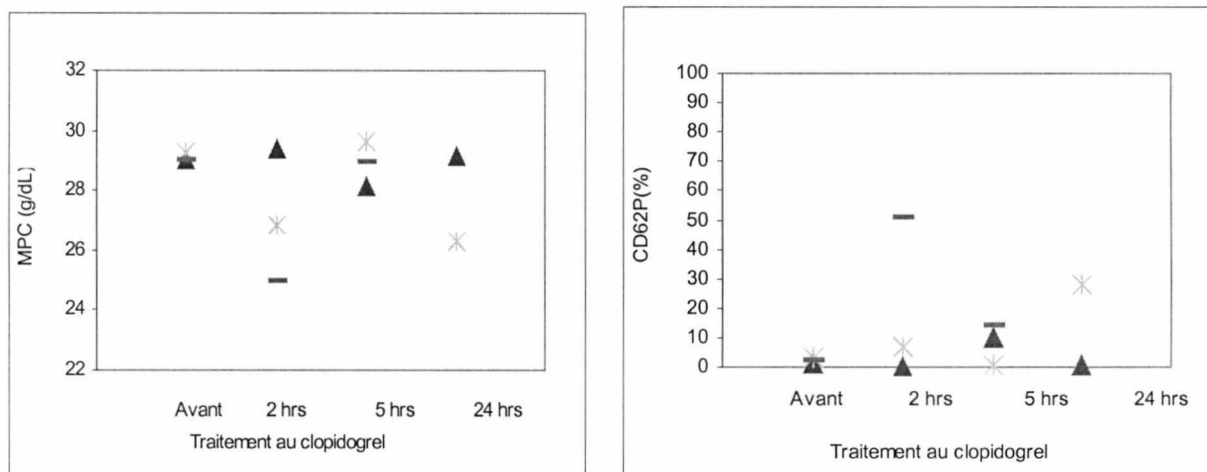


Figure 3. 9 : Absence d'activation des plaquettes avant traitement et présence d'activation après traitement au clopidogrel, n=3, exprimée par le MPC mesuré par l'ADVIA 120 (figure de gauche) et le pourcentage de CD62P mesuré par la cytométrie de flux par immunofluorescence (figure de droite).

3. 2. 3. 2 Résultats du groupe abciximab

Temps de mesure	Avant	10 minutes	2 heures	24 heures après
MPC (g/l) Valeur p	26.6 ± 0.6	27.7 ± 0.8 0.066	28.7±0.8 0.005	28.2 ± 0.8 0.011
CD62P (%) Valeur p	26.3±16.42	—	1.10 ± 0.90 0.021	0.47 ± 0.34 0.025

Tableau 3. 8 : Groupe de patients abciximab (n=5), avec activation des plaquettes avant traitement, mesure des paramètres plaquettaires MPC par l'ADVIA 120 et le pourcentage de CD62P par la cytométrie de flux par immunofluorescence avant et après administration d'abciximab. Les données sont présentées en moyenne ± écart-type pour le MPC et le pourcentage de CD62P.

Dans ce groupe 5 patients (33%), présentent une augmentation du pourcentage de CD62P avant traitement et répondent au traitement par une diminution significative du pourcentage de fluorescence CD62P, exprimée en pourcentage, deux heures et vingt quatre heures après ($p < 0.05$; respectivement). De même pour le MPC, l'efficacité de l'abciximab est déterminée par une élévation significative des valeurs, deux heures et vingt quatre après ($p < 0.05$; respectivement) (tableau 3.8) (figure 3.10a et 3.10b).

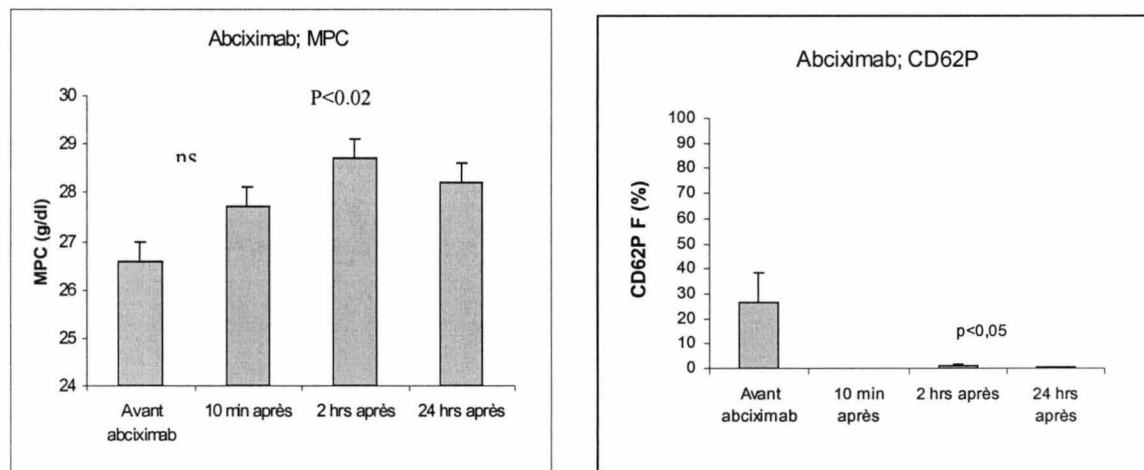


Figure 3.10a : Groupe de patients avec activation des plaquettes avant traitement et effet inhibiteur de l'abciximab, n=5. Les valeurs du MPC et de CD62P-PE sont exprimées moyenne \pm SEM.

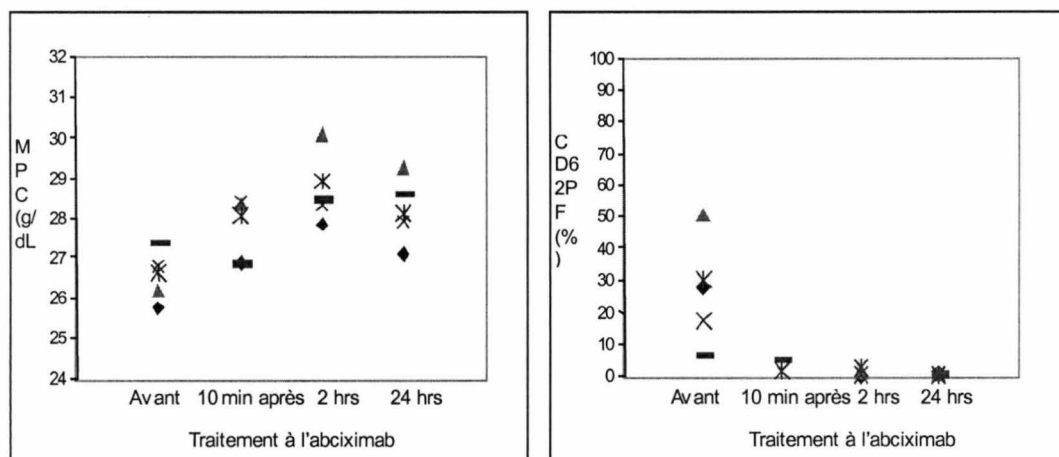


Figure 3.10b : Réponse individuelle de l'effet inhibiteur de l'abciximab sur l'activation plaquettaire, n=5.

Temps de mesure	Avant	10 minutes	2 heures	24 heures après
MPC (g/dl) Valeur p	28.6 ± 0.7	28.6 ± 0.7 0.625	28.5 ± 0.7 0.514	28.8 ± 0.8 0.096
CD62P(%) Valeur p	0.81±1.17	0.66±0.08 0.490	1.4±2.16 0.217	0.96±0.57 0.848

Tableau 3. 9 : Groupe de patients abciximab (n=6), sans activation des plaquettes avant traitement, mesure des paramètres plaquettaires MPC par l'ADVIA 120 et le pourcentage de CD62P par la cytométrie de flux par immunofluorescence avant et après administration d'abciximab. Les données sont présentées en moyenne ± écart-type pour le MPC et le pourcentage de CD62P.

Dans ce groupe 6 patients, où on ne retrouve pas d'activation plaquettaire avant traitement, les valeurs du pourcentage de CD62P et du MPC ne présentent aucun changement significatif et ne sont pas modifiées par l'abciximab (tableau 3. 9) (figure 3. 11a et 3. 11b).

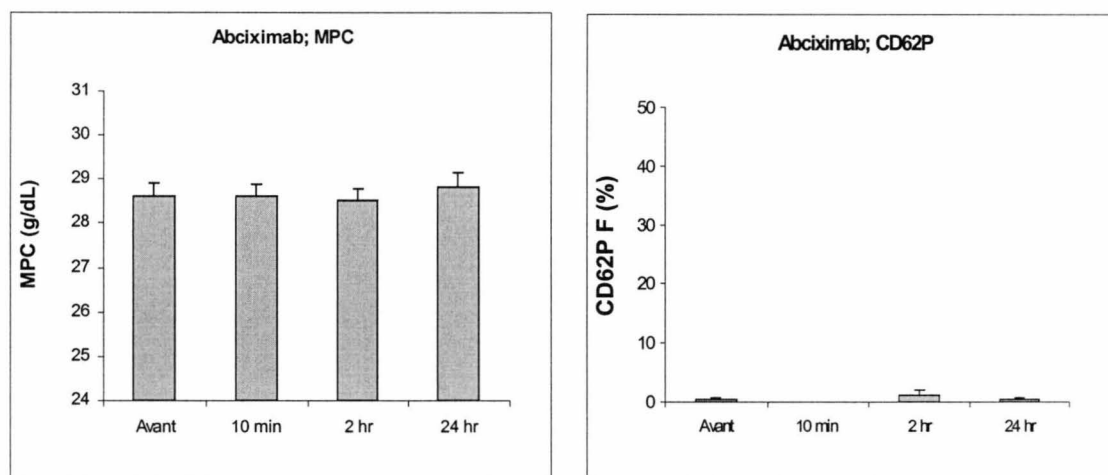


Figure 3. 11a : Groupe de patients abciximab sans activation des plaquettes avant et après traitement, n=6. Les valeurs du MPC et de CD62P-PE sont exprimées en moyenne \pm SEM.

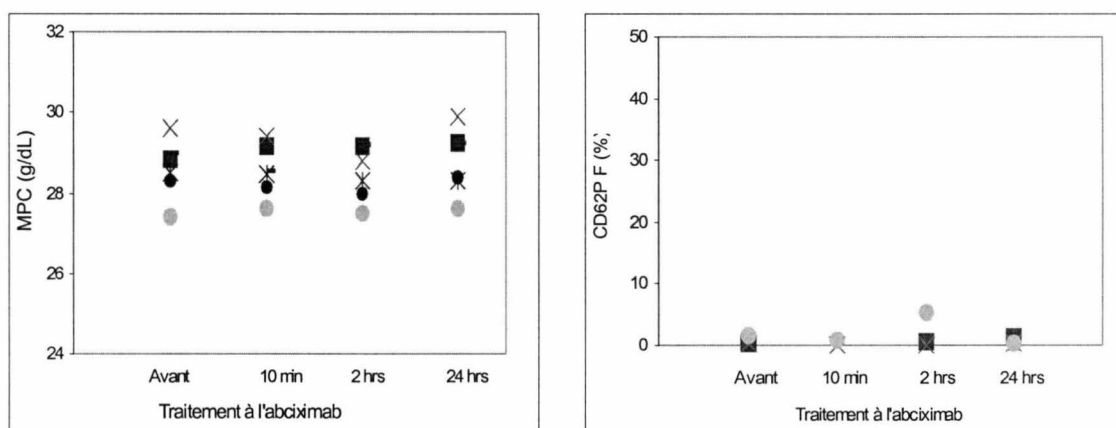


Figure 3. 11b : Patients du groupe abciximab (n=6), sans activation plaquettaire avant et après traitement à l'abciximab.

Par ailleurs, on observe une activation des plaquettes chez 4 patients et cela malgré l'effet inhibiteur de l'abciximab sur l'agrégation plaquettaire qui se traduit par une baisse non significative du MPC, dix minutes ($p=0.069$) et deux heures après ($p=0.110$) mais suffisamment significative vingt quatre heures après ($p=0.028$). De façon parallèle, une élévation non significative du pourcentage de CD62P, dix minutes ($p=0.482$) et deux heures après ($p=0.247$) (figure 3.12).

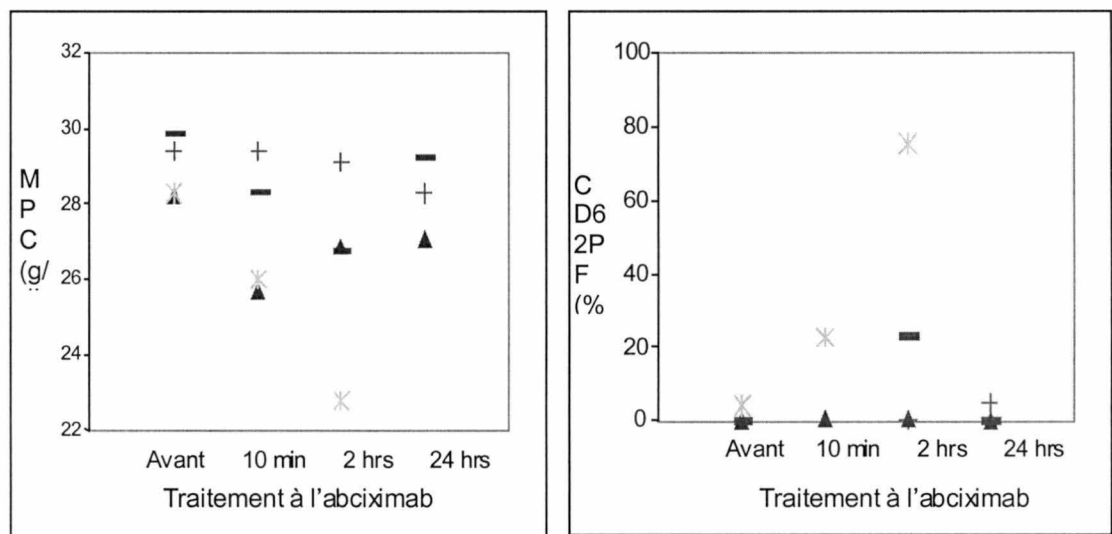


Figure 3. 12 : Absence d'activation des plaquettes avant traitement et présence d'activation plaquettaire après administration d'abciximab, n=4, exprimée par le MPC mesuré par l'ADVIA 120 (figure de gauche) et le pourcentage de CD62P mesuré par la cytométrie de flux par immunofluorescence (figure de droite).

3. 2. 3. 3 Relation entre MPC et l'expression de CD62P

L'analyse de la régression linéaire, par la méthode des moindres carrés a permis de comparer l'évaluation de l'activation des plaquettes avant traitement chez tous les patients des deux groupes clopidogrel et abciximab et montrent une corrélation entre les deux paramètres, MPC et l'expression de CD62P exprimée en pourcentage de fluorescence ($r = -0.82$; $p < 0.001$, $n = 44$), qui sont deux mesures de l'activation plaquettaire inversement proportionnelles (figure 3.13).

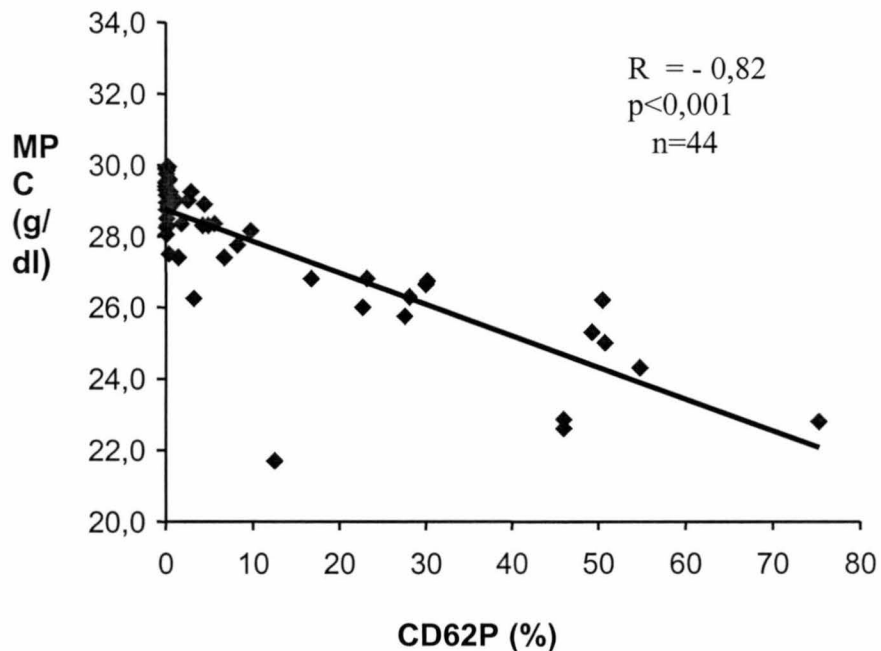


Figure 3. 13 : Corrélation entre les paramètres plaquettaires, MPC mesuré par l'ADVIA 120 et le pourcentage de CD62P mesuré par la cytométrie de flux par immunofluorescence.

3. 2. 4 Le suivi des patients

Nous avons considéré, des évènements positifs, toutes complications survenant après thérapie antiplaquettaire à type d'AI, d'IM avec ou sans ICP, ou pontage aorto-coronarien survenant durant la période de suivi de trois mois après hospitalisation.

3. 2. 4. 1 Groupe des patients avec activation plaquettaire avant traitement

Parmi les 16 patients activés à l'admission, 4 d'entre eux ont présenté des récurrences à type d'AI avec ICP ou pontage aorto-coronarien, survenant après l'arrêt du traitement d'entretien au clopidogrel.

3. 2. 4. 2 Groupe des patients sans activation plaquettaire avant traitement

Parmi les 28 patients non activés à l'admission, 5 patients ont présenté des récurrences à type d'AI, IM, MCS stable, ICP ou pontage aorto-coronarien. Un patient sans activation des plaquettes avant et après traitement a eu un pontage aorto-coronarien trois mois après. Il est important de noter que ces complications survenaient à l'arrêt de la thérapie antiplaquettaire. Parmi les 7 patients (3 clopidogrel et 4 abciximab) qui n'ont pas présenté d'activation des plaquettes avant traitement

mais seulement après administration de l'antiplaquettaire, 3 patients du groupe clopidogrel ont eu des complications. En effet, un patient a eu une AI, deux jours après la dose charge de clopidogrel, un autre patient a eu une AI à deux reprises. La première AI est survenue dix jours après la dose charge et la deuxième fois vingt jours après. Le troisième a subi une MCS post-ICP quatorze jours après la dose charge. Un patient du groupe abciximab a présenté un IM deux mois après l'arrêt du traitement. Néanmoins, ce sont de résultats préliminaires qui nécessitent une étude approfondie.

3. 2. 5 Mesure de l'agrégation plaquettaire

3. 2. 5. 1 Effet des antiplaquettaires sur l'agrégation des plaquettes

L'abciximab bloque l'étape finale commune de l'agrégation plaquettaire, en inhibant la liaison du fibrinogène au récepteur de la GPIIb/IIIa, et empêche ainsi les plaquettes de s'agréger entre elles qui circulent librement. Afin d'évaluer l'effet inhibiteur de l'abciximab, nous avons mesuré le compte des plaquettes par le système hématologique ADVIA 120 dans le sang total prélevé sur citrate de sodium. Les résultats du compte des plaquettes sont exprimés en moyenne \pm écart-type. Les résultats montrent que dans le groupe clopidogrel, le compte des plaquettes a augmenté graduellement et de façon significative vingt quatre heures après traitement

($p < 0.001$), mais cette augmentation demeure insignifiante et peu intéressante cliniquement (figure 3. 14). Dans le groupe abciximab, les résultats ont montré que tous les patients ont réagi au traitement par une augmentation rapide du compte des plaquettes, dix minutes après ($p = 0.001$). L'effet inhibiteur de l'abciximab sur l'agrégation plaquettaire est maximal (90 %) au bout de dix minutes (figure 3.15). Un patient a cependant développé une thrombocytopénie.

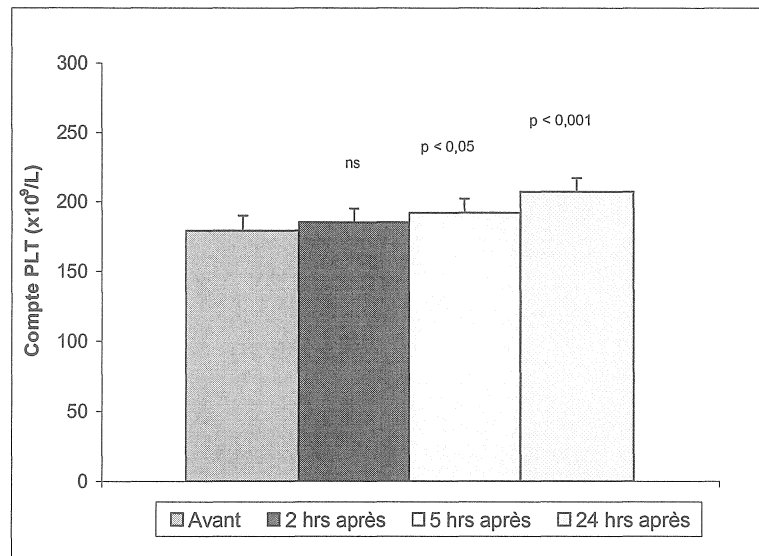


Figure 3. 14: Effet du clopidogrel sur le taux de plaquettes, n=29

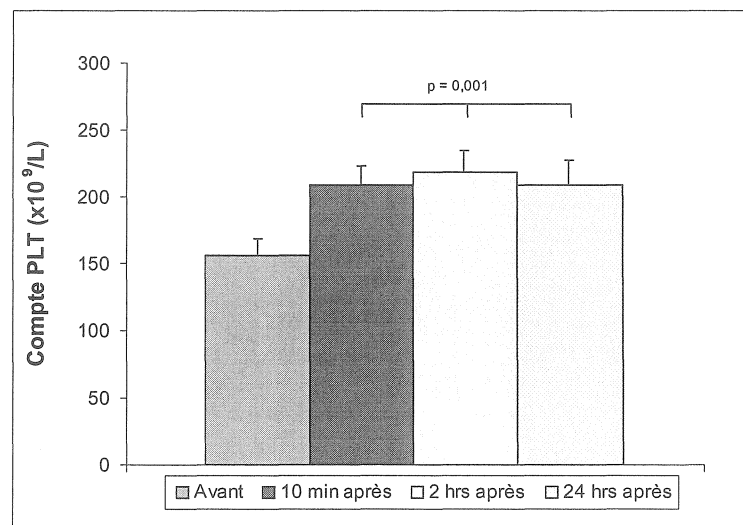


Figure 3. 15: Effet de l'abciximab sur le taux de plaquettes, n=14

3. 2. 5. 2 Mesure de l'agrégation plaquettaire par le système PFA-100

		Temps de fermeture : (Closure time , CT(s))		
		Avant	24 heures après	p
Abciximab	Tous les patients	205 ± 86	278 ± 62	0.016
	le nombre de patients avec CEPI > 191 s	5/10	9/10	
Clopidogrel	Tous les patients	226 ± 70	241 ± 75	0.438
	le nombre de patients avec CEPI > 191 s	10/19	13/19	
		Valeurs normales: Collagen/Epinephrine (CEPI) < 191 s		

Temps de fermeture (CT): Les résultats sont représentés par le nombre de patients avec CT anormal (CEPI >191).

Tableau 3. 10 : Mesure du temps de fermeture (CT), par le PFA-100

Le temps de fermeture (CT) de collagène-épinephrine (CEPI) mesuré par le PFA-100 est prolongé avant traitement chez 5 patients sur 10 du groupe abciximab, et chez 10 patients sur 19 du groupe clopidogrel. Les résultats anormaux (CEPI >191)s obtenus avec la cartouche d'essai de CEPI (avant médication anti-plaquettaire) peuvent avoir été causé par l'effet de l'aspirine administrée chez les patients à l'admission. Par contre, vingt quatre heures après le traitement à l'abciximab, le CEPI est allongé chez la majorité de ces 10 même patients, la comparaison est significative ($p=0.016$). Ces résultats s'expliquent par l'effet inhibiteur puissant de l'abciximab sur la voie finale de l'agrégation plaquettaire. Si on analyse les résultats du groupe clopidogrel, on constate qu'il n'y a pas de différence significative avant ou après prise de clopidogrel, la plupart des patients ont un CEPI allongé avant et vingt quatre heures après, ce qui n'est pas surprenant étant donné que le clopidogrel agit comme inhibiteur d'une des voies de l'activation plaquettaire(tableau 3. 10).

3. 3 Relation entre l'activation plaquettaire et le marqueur de l'inflammation la PCR

Le tableau suivant résume les valeurs du MPC et de la PCR avant traitement antiplaquettaire, de chacun des deux groupes, patients activés versus non activés des patients clopidogrel et abciximab. La différence entre les deux groupes est statistiquement significative pour le MPC ($p<0.0001$) et pour la PCR ($p<0.05$) (tableau 3. 11).

Activation des plaquettes avant traitement			
	Groupe 1	Groupe 2	
	n=16	n=28	
MPC (g/dl)	25.94 ± 2.10	28.95 ± 0.74	p<0.0001
PCR (mg/l)	12.58 ± 17.3	4.35 ± 6.48	p<0.05

Tableau 3. 11 : Valeurs du MPC et de la PCR avant traitement.
Les données sont exprimées en moyenne ± écart-type pour le MPC et la PCR.

D'autre part, la relation entre l'activation des plaquettes et le marqueur de l'inflammation la PCR a été testée par le test du Khi². Nous avons comparé à avant la prise d'antiplaquettaire, l'état des plaquettes des patients, en mesurant le MPC et la PCR de tous les patients clopidogrel et abciximab. L'illustration graphique de la relation réciproque entre la sensibilité et la spécificité du test pour différentes valeurs utilisées comme critère de normalité de la PCR obtenue à partir de la courbe COR (receiver-operating characteristic curve) donne à la valeur 4.28 mg/l, la sensibilité maximale de 71.4% et la spécificité maximale de 81.3%. À partir de cette valeur, nous avons déterminé les patients avec PCR élevée dans le groupe de patients avec plaquettes activées (n=16) et non activées (n= 28). Parmi les 16 patients qui présentent une activation des plaquettes avant traitement, 13 patients (81%) ont un taux de PCR élevée (> 4,28mg/l) et 3 patients ont un taux de PCR non élevée (< 4.28mg/l). Parmi les 28 patients sans activation plaquettaire avant traitement, 8 des

patients ont un taux de PCR élevée (> 4,28mg/l) et 20 patients (71%) ne présentent aucune élévation de la PCR (< 4.28mg/l). Ce qui signifie que l'on retrouve le pourcentage le plus important de PCR élevée chez les patients qui présentent une activation plaquettaire avant administration d'antiplaquettaires. La relation entre le MPC et la PCR testée par le test du khi² montre une relation significative entre les deux paramètres (p< 0.001) (tableau 3. 12).

Activation des plaquettes (avant traitement)		
PCR (mg/l) Avant traitement	Présence n=16 12.58 ± 1.73	Absence n=28 4.35 ± 6.48
PCR > 4.28 mg/l	n = 13 (81%)	n = 8 (29%) p< 0.001
< 4.28mg/l	n = 3 (19%)	n = 20 (71%) Sensibilité 71.4% Spécificité 81.3%

Tableau 3. 12 : Relation entre l'activation des plaquettes et la PCR

3. 4 Relation entre l'activation plaquettaire et la troponine I

Dans le groupe clopidogrel, 3 patients avec ou sans plaquettes activées, ont des valeurs de troponine I supérieures à 0.1ng/ml (0.1ng/ml :considérée comme la valeur de référence de la troponine I), respectivement avant deux heures, cinq heures et vingt quatre heures après. Par ailleurs, 6 patients avec ou sans plaquettes activées, ont une troponine I supérieure à 0.1ng/ml, seulement vingt quatre heures après, le reste des patients également avec ou sans plaquettes activées ont une troponine I négative. Il n'y a aucun lien entre le fait qu'ils soient activés ou non à l'admission, ce qui est le cas aussi pour le groupe abciximab. Les résultats ne démontrent pas de relation statistiquement significative entre l'activation plaquettaire et le marqueur des dommages myocardiques, la troponine I.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

4. 1 Étude de l'effet de différents anticoagulants sur l'activation des plaquettes *in vitro*.

Les plaquettes sanguines sont des cellules qui s'activent facilement lorsqu'elles sont manipulées lors des procédures expérimentales ou tout simplement lorsqu'elles sont laissées longtemps à température ambiante. Pour prévenir l'activation spontanée des plaquettes, le sang doit être collecté dans un milieu qui empêchera non seulement la coagulation, mais préservera également le statut d'activation des plaquettes jusqu'à ce que les échantillons puissent être analysés (GEORGE et al., 1981 ; HAWIGER, 1989 ; WU, 1994 ; MICHELSON, 1996). Ceci, dépend nettement de l'anticoagulant dans lequel le sang est collecté (GOLANSKI et al., 1996).

À cet effet, l'étude comparative des trois anticoagulants (citrate de sodium, EDTA, CTAD) sur la fonction des plaquettes par stimulation du sang total et des plaquettes isolées avec de la thrombine a montré une augmentation de l'expression plaquettaire de CD62P et de façon concomitante une diminution du MPC. En effet, la thrombine, inducteur de l'activation plaquettaire, induit un changement notable des plaquettes prélevées avec du citrate de sodium et de l'EDTA, avec une réduction significative du MPC. Par contre, aucun changement notable du pourcentage de CD62P et du MPC n'est observé dans les tubes avec CTAD.

L'étude des plaquettes isolées initialement prélevées sur CTAD a montré une activation induite par la thrombine indiquant que les plaquettes restent fonctionnelles et une fois isolées du sang total elles deviennent activables. Ces résultats indiquent que le CTAD a un rôle protecteur dans le sang total comme cela a été démontré dans d'autres études (KÜHNE et al., 1995 ; NEUFELD et al., 1999). Il empêche l'activation des plaquettes par plusieurs mécanismes, la théophylline et le dipyridamole composants du CTAD qui bloquent la phosphodiesterase, avec pour résultat une augmentation de l'AMP cyclique et une diminution de la réponse des plaquettes (MILLS, 1982 ; GRESELE et al., 1986). L'adénosine autre composant du CTAD est un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire induite suite à l'activation des plaquettes par la thrombine. Celui-ci empêche l'élévation du calcium intracellulaire bloquant la sécrétion des granules plaquettaires (FEOHTISTOV et al., 1992). Les composants de CTAD ont donc pour effet d'inhiber l'activation plaquettaire.

L'EDTA est l'anticoagulant de choix recommandé par le National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), sur lequel sont prélevés les échantillons de sang qui serviront à analyser les paramètres sanguins d'un hémogramme, principalement pour ses propriétés de conservation des cellules sanguines. En routine, la majorité des échantillons de sang sont analysés dans un délai de 30 à 60 minutes après prélèvement de sang. Ils ne doivent pas être conservés plus longtemps à température ambiante car l'EDTA peut induire une agrégation *in vitro* responsable de fausses thrombopénies. Le citrate de sodium cause l'activation *in vitro* des plaquettes

de façon moins spontanée que l'EDTA (GOLANSKI et al., 1996).

Les résultats indiquent que le CTAD inhibe l'activation plaquettaire *in vitro* et peut-être utile dans la stabilisation de l'activation plaquettaire *in vivo*. Afin de valider l'utilisation du CTAD, il est nécessaire de procéder à d'autres études, dans des contextes cliniques pathologiques qui s'accompagne d'activation plaquettaire. Les échantillons de sang des patients coronariens ont été prélevés sur EDTA qui donne aux plaquettes une stabilité acceptable mesurée dans l'intervalle d'une heure. De plus, dans l'EDTA, les plaquettes gardent leur forme sphérique ce qui permet de mesurer le MPC par l'ADVIA 120 dont les calculs sont fondés sur la propriété de dispersion de la lumière, des particules sphériques, principe de mesure de l'ADVIA 120 (ZELMANOVIC et al., 1998).

4. 2 Évaluation de l'état des plaquettes chez les patients coronariens avec traitement antiplaquettaire

La prévention secondaire des maladies coronariennes incluant l'utilisation des antiplaquettaires continue d'être un sujet d'actualité. Nous sommes toujours à la recherche de moyens de suivi des interventions auprès des patients atteints de SCA et qui bénéficient d'une thérapie antiplaquettaire. Il y a toute une panoplie de moyens diagnostiques et pronostiques à notre disposition, et nous cherchons, à en tirer le meilleur rapport risque-bénéfice.

4. 2. 1 Aspects méthodologiques

Cette étude préliminaire et exploratoire a été élaborée avec une méthodologie rigoureuse, afin d'évaluer l'état de la fonction d'activation des plaquettes avant traitement et de déterminer la réponse au traitement antiplaquettaire, mesurés à des intervalles de temps différents sur l'activation et l'agrégation plaquettaire. L'utilisation d'un moyen de mesure de l'activation des plaquettes simple et accessible en routine s'avère nécessaire. Malgré l'importance d'une telle prise en charge, la recension des écrits a révélé que les moyens utilisés actuellement sont peut-être utiles comme c'est le cas de la cytométrie par immunofluorescence, mais son utilisation comporte des limites.

Cette étude clinique soulève une hypothèse intéressante, à savoir si le MPC, mesurant la concentration intracellulaire des plaquettes sanguines, permet d'évaluer directement la fonction d'activation plaquettaire, chez des patients coronariens avec ICP et sous antiplaquettaires. Très peu de recherches ont étudié la perspective d'utiliser le MPC comme mesure de l'activation plaquettaire chez des patients coronariens subissant l'ICP et sous antiplaquettaires, ce qui constitue en soi une limite. Néanmoins, des études cliniques préliminaires ont tenté cette approche chez des volontaires sains et ont montré une corrélation entre le MPC et le pourcentage de CD62P (CHAPMAN et al., 2003 ; AHNADI et al., 2003). Ces résultats nous amènent à exploiter l'idée d'utiliser la mesure de la concentration intracellulaire des plaquettes

dans un contexte clinique pathologique bien défini qui est celui des SCA, où l'implication directe de l'activation plaquettaire est bien documentée.

La méthodologie utilisée dans le cadre de cette recherche a l'avantage de ne présenter aucun risque pour le patient étant donné que l'intervention se limite à des prises de sang avant et après prise médicamenteuse. De ce fait, le patient est son propre contrôle et la taille de l'échantillon considérée a permis d'identifier avant traitement des patients avec et sans activation plaquettaire. Elle a su répondre à l'objectif d'établir des corrélations entre la plupart des paramètres.

4. 2. 1. 1 Population à l'étude

L'un de nos devis de recherche exigeait la mesure de l'état basal des plaquettes et cela nous obligeait à recruter les patients juste avant l'intervention. Malgré les conditions particulières dans lesquelles s'est déroulé le recrutement des participants, en salle d'hémodynamie, les patients ont montré un grand intérêt à participer à l'étude. Le choix des critères d'inclusion et d'exclusion précis a rendu le recrutement rapide mais a limité le nombre des sujets admissibles au projet, parce que certains patients reçoivent en association le clopidogrel et l'abciximab durant l'ICP, et de ce fait sont exclus de l'étude. Pour la simple raison que les deux médicaments ont des mécanismes d'action différents et que l'un des objectifs spécifiques de cette étude est de déterminer

la réponse des plaquettes aux inhibiteurs plaquettaires, clopidogrel ou abciximab. Les patients ayant refusé de participer à l'étude ont les mêmes caractéristiques que les participants, trois patients du groupe clopidogrel et un du groupe abciximab. Les seules raisons de leur refus étant dues à l'inquiétude reliée à leur état de santé et l'obligation de subir plusieurs prélèvements sanguins.

Une certaine hétérogénéité des participants a aussi été atteinte : bonne étendue au niveau de l'âge, dont la moyenne de l'échantillon est de 59 ans pour les deux groupes clopidogrel et abciximab. Le pourcentage d'hommes est plus important (77%) pour tous les patients des deux groupes. Ces résultats rejoignent ceux de la base de données du programme FASTRAK II regroupant 5881 patients ayant fait un IM où 68,9 % étaient des hommes (Fondation des maladies du cœur du Canada. Ottawa, Canada 1999).

4. 2. 1. 2 Instruments de mesure

L'évaluation de l'activation des plaquettes par le système automatisé ADVIA 120 s'est déroulée sans difficultés, il n'y avait aucune préparation des plaquettes à faire avant l'analyse, ce qui est fort avantageux et a permis de limiter au maximum leur manipulation et réduire l'activation plaquettaire *in vitro* induite lors des procédures expérimentales. Les conditions de prélèvement, transport et manipulation des plaquettes ont été strictement contrôlés. Les mesures ont été faites dans l'intervalle d'une heure.

L'évaluation de l'activation plaquettaire par la cytométrie de flux par immunofluorescence comporte certaines contraintes. Premièrement, cette technique nécessite la manipulation des plaquettes, elle inclut la fixation des échantillons de sang avec du formaldéhyde, et le marquage avec les anticorps monoclonaux. Deuxièmement, elle nécessite aussi la calibration de l'appareil ainsi que l'ajustement des paramètres du système informatique relié à l'instrument nécessaire à l'interprétation des résultats. Troisièmement, cet instrument de mesure est inaccessible en routine.

Le système PFA-100 est un instrument de mesure disponible au laboratoire d'hématologie. La mesure de l'agrégation plaquettaire des échantillons de sang doit être faite dans un délai de deux heures, et nécessite la disponibilité des techniciens du même laboratoire.

4. 2. 2 Discussion des résultats

La présente étude est la première à évaluer l'activation plaquettaire dans une population de coronariens soumis à une angioplastie et sous médicaments antiplaquettaires avant et après la procédure de dilatation, en utilisant la mesure de la concentration du contenu des plaquettes ou densité plaquettaire, MPC mesuré par un système automatisé l'ADVIA 120.

4. 2. 2. 1 Évaluation de l'activation plaquettaire par le pourcentage de CD62P et le MPC

L'évaluation comparative de l'activation des plaquettes avant et après prise de clopidogrel ou d'abciximab s'est faite à l'aide du test de Student (t-paired) et le seuil de signification a été établi à $p < 0,05$. L'analyse individuelle de chaque patient des groupes clopidogrel et abciximab, a permis de les regrouper en se basant sur la présence ou l'absence de plaquettes activées avant la thérapie antiplaquettaire et la procédure d'ICP, en deux groupes :

- Groupe de patients avec plaquettes activées avant traitement
- Groupe de patients sans plaquettes activées avant traitement

Certains auteurs préconisent d'étudier le retentissement biologique individuel des antiplaquettaires sur le fonctionnement des plaquettes, notamment parce qu'il semble exister une importante variation interindividuelle de l'effet inhibiteur (MASCELLI et al., 1997 ; SMITH et al., 1999 ; BIHOUR et al., 1999).

4. 2. 2. 1. 1 Groupe de patients avec plaquettes activées avant traitement

Au total 16 patients (clopidogrel, $n=11$; abciximab, $n=5$) présentent des plaquettes activées avant administration de clopidogrel ou d'abciximab et un effet inhibiteur du traitement sur l'activation plaquettaire a été observé qui se traduit par une absence de plaquettes activées.

Dans le groupe clopidogrel, 11 patients ont répondu au traitement par une inhibition de l'activation des plaquettes, qui témoigne de l'efficacité du clopidogrel, respectivement deux heures, cinq heures, vingt quatre heures après. La comparaison est suffisamment significative ($p < 0.01$). Parallèlement, la cytométrie de flux, montre des résultats similaires respectivement deux heures, cinq heures, vingt quatre heures après la prise thérapeutique ($p < 0.01$). Il a été démontré que le clopidogrel administré par voie orale à une dose charge de 300 mg a un effet inhibiteur à partir de la deuxième heure et un effet maximum au bout de la cinquième heure évalué à 80% (MILLS et al., 1992). Dans le groupe abciximab, 5 patients ont répondu au traitement deux heures après ($p < 0.01$) et vingt quatre heures après ($p < 0.05$). L'abciximab est un inhibiteur puissant de l'agrégation plaquettaire agissant sur l'étape finale. Il est administré par voie parentérale, son effet est immédiat et maximum au bout de deux heures. En effet, des études cliniques ont montré qu'il est capable de bloquer l'activation et 80% à 90% de l'agrégation plaquettaire (MASCELLI et al., 1998 ; BIHOUR et al., 1999). De plus, le relais thérapeutique est pris avec du clopidogrel par voie orale.

La majorité des patients recrutés dans notre étude ont des antécédents personnels de SCA et sont donc sous aspirine de façon prolongée. Bien que l'aspirine réduise le risque de resténose et de thrombose au cours d'IM aigu chez les patients avec ICP (SCHWARTZ et al., 1988 ; BARNATHAN et al., 1987), il a été rapporté que ses effets sur la fonction des plaquettes sont relativement faibles, et les événements ischémiques continuent à se produire (GILES et al., 1994), c'est probablement ce qui

explique l'activation plaquettaire présente chez ces patients avant l'administration d'inhibiteurs plaquettaires, clopidogrel ou abciximab.

Plusieurs études cliniques suggèrent qu'il y a différentes réponses à l'aspirine. Quelques patients ont des événements vasculaires récurrents en dépit de la thérapie à long terme d'aspirine, soulevant la possibilité qu'ils soient résistants à l'aspirine. Eikelboom et collaborateurs ont estimé que le pourcentage de résistance à l'aspirine se situe entre 9% à 24% chez les patients cardiaques stables. Ils ont défini l'association entre l'excrétion urinaire de thromboxane A2 malgré le traitement à l'aspirine et le risque d'événements cardiovasculaires chez les patients avec une thérapie à long terme d'aspirine et ont conclu que la résistance à ce médicament augmente le risque de décès cardiaque. Les auteurs de cet article spéculent au sujet du rôle des cellules nucléées (endothélium, monocytes) dans la résistance à l'aspirine. Ces cellules pourraient fournir la prostaglandine H2, un précurseur du thromboxane A2, même au cours du traitement à l'aspirine, par l'intermédiaire des voies d'enzymes la cyclooxygénase-1 (Cox-1) ou de la cyclooxygénase-2 (Cox-2). Ces mêmes auteurs ont pensé à d'autres explications possibles, comme le traitement à base de statines de l'hypercholestérolémie, chez les sujets hypercholestérolémiques, et ont rapporté que l'agrégabilité des plaquettes et la production de thromboxane A2 sont augmentées et que les effets antithrombiques de l'aspirine sont bloqués (EIKELBOOM et al., 2002).

L'hypercholestérolémie est un des facteurs de risques majoritaire chez nos patients. La présence de plaquettes activées à l'admission dans notre groupe de patients, peut s'expliquer par une résistance à l'aspirine.

4. 2. 2. 1. 2 Groupe de patients sans activation plaquettaire avant traitement

Dans ce groupe, au total 28 patients, parmi eux 21 patients (n=15 clopidogrel ; n= 6 abciximab) sans activation plaquettaire avant et après traitement. Le pourcentage de CD62P et les valeurs du MPC ne sont pas modifiées par le médicament. La prise quotidienne d'aspirine s'est avérée protectrice et efficace avant ICP et elle est probablement responsable de l'absence de plaquettes activées avant traitement chez ces 21 patients et renforcée par la prise d'antiplaquettaire après ICP. Les 7 autres patients (clopidogrel, n= 3 ; abciximab, n= 4) sans activation plaquettaire avant traitement ont présenté une activation des plaquettes seulement après l'administration médicamenteuse et cela malgré l'effet inhibiteur du médicament. L'explication la plus probable est que la manœuvre d'ICP aurait déclenchée une activation des plaquettes comme cela a été rapporté dans la littérature (WILENTZ et al., 1987 ; BAUTERS et al., 1996 ; SCHOMIG et al., 1996 ; INOUE et al., 1996 ; KOMATSU et al., 1998) et ces patients ont présenté une résistance au traitement antiplaquettaire. Dans la littérature, l'incidence de la résistance du médicament n'a pas été étudiée

intensivement. La variabilité interindividuelle en réponse au clopidogrel peut affecter des résultats cliniques, Gurbel et collaborateurs rejoignent cette idée. Ces auteurs ont étudié les différentes réponses au clopidogrel chez les patients subissant l'ICP et sous clopidogrel, en mesurant l'agrégation des plaquettes et d'autres marqueurs d'activation des plaquettes par cytométrie de flux, durant trente jours après angioplastie. Ils ont rapporté la fréquence de la résistance du clopidogrel et ont également étudié l'influence de la réactivité des plaquettes avant traitement sur le médicament. Cette étude illustre la réponse inhibitrice variable des plaquettes à la dose administrée standard de clopidogrel. La réponse au clopidogrel est en effet hétérogène et une résistance au médicament est observée (GURBEL et al., 2003 ; JAREMO et al., 2002). Notre définition de la résistance au médicament clopidogrel est empirique parce qu'il n'y a eu aucun rapport étendu à ce sujet parmi des patients traités avec le clopidogrel à part quelques observations de rares études. Le travail actuel soutient également d'autres investigations pour déterminer si des doses plus élevées de clopidogrel peuvent surmonter des différences interindividuelles dans la réponse au médicament. De façon générale, les mécanismes physiopathologiques de la thrombose coronarienne sont complexes, plusieurs voies interviennent dans l'activation plaquettaire et peuvent être actives et responsables de la persistance de l'activation des plaquettes. Le clopidogrel inhibe seulement la voie d'activation des plaquettes par l'ADP.

En ce qui concerne l'abciximab, certains auteurs ont émis l'hypothèse qu'en bloquant les récepteurs pour l'agrégation, il empêche le fibrinogène de former un pont entre deux GPIIb/IIIa augmentant ainsi la disponibilité du fibrinogène qui se retrouve libre et agit en stimulant la dégranulation des granules alpha plaquettaire et donc l'activation plaquettaire avec l'expression de la P-sélectine (ROSSI et al., 2001).

Par ailleurs, beaucoup de facteurs peuvent influencer la réponse des plaquettes aux antagonistes de la GPIIb/IIIa chez ces patients. L'agrégabilité des plaquettes avant que le traitement soit instauré peut varier en fonction des facteurs de risque primaires, tels que l'hypertension artérielle, hypercholestérolémie, le diabète, le tabagisme, l'effort et la sédentarité. Ces facteurs augmentent l'agrégabilité des plaquettes, qui peut rendre celles-ci moins (ou parfois plus) sensibles aux antagonistes de la GPIIb/IIIa (KENNETH et al., 2001)

D'autres auteurs ont montré à travers leurs études qu'en dépit du blocus étendu des récepteurs de GPIIb/IIIa provoqué par l'administration d'abciximab, les récepteurs de GPIb sont restés disponibles pour l'adhésion du facteur de Von Willebrand. Ceci est en accord avec les résultats d'études qui ont montré que l'administration d'abciximab chez des patients, n'a pas affecté l'adhésion des plaquettes au collagène, dans des conditions où les forces de cisaillements sont anormalement élevées dans le sang, une situation qui dépend entièrement de l'interaction de la GPIb et du facteur de Von Willebrand (TURNER et al., 1995 ; KONSTANTOPOULOS et al., 1995). Bien que les inhibiteurs de GPIIb/IIIa empêchent potentiellement l'agrégation des

plaquettes, ils n'empêchent pas l'adhésion, l'activation, ou la sécrétion des plaquettes aux niveau des dommages vasculaires. Cela, exigent peut-être des interventions thérapeutiques quelque peu différents et/ou additionnels, intervenant à différents niveaux de l'activation plaquettaire (KENNETH et WILLERSON, 2001).

Selon Schneider et collaborateurs, l'activation continue des plaquettes en dépit de l'utilisation de la thérapie antiplaquettaire chez les sujets avec SCA peut refléter l'insuffisance du traitement antithrombotique, l'insuffisance de la thérapie d'antiplaquettaire, ou des deux traitement antithrombotique et antiplaquettaire (SCHNEIDER et al., 1997). Récemment, il a été montré chez des patients soumis à l'ICP, qu'une augmentation de la dose quotidienne d'aspirine de 150 mg et de la dose charge de clopidogrel de 600 mg a montré une inhibition de maximale de l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP, quatre heures après l'administration de médicaments et de l'ICP (MÜLLER et al., 2001 ; GAWAZ et al., 2001). Une autre étude récemment publiée par Müller et collaborateurs, sur 105 patients avec syndromes coronariens stables soumis à l'ICP et des antiplaquettaires en association, aspirine et clopidogrel. Ces patients ont reçu quotidiennement 100mg d'aspirine et avant ICP une dose charge de clopidogrel de 600 mg, l'agrégation plaquettaire par agrégométrie optique a été étudiée avant la dose charge, quatre et vingt quatre heures après. 11 % étaient des non répondeurs plutôt que des résistants au traitement et 9 à 26% étaient des semi-répondeurs. Ces non répondeurs ont un risque élevé de développer une thrombose subaiguë post endoprothèse.

Ces résultats justifient le traitement de ces patients avec une stratégie thérapeutique alternative (MÜLLER et al., 2003).

Il est clair que les mécanismes d'activation plaquettaire sont multiples et complexes et si on ne peut pas tous les contrôler, on peut penser à l'effet bénéfique de l'association d'antiplaquettaires et en ajuster la dose, dans la prise en charge des thromboses coronariennes comme cela été démontré dans la littérature; à condition de disposer de tests rapides et pratiques en routine pour évaluer l'efficacité du traitement et palier aux effets secondaires de ce traitement. Dans tous les cas, nous avons pensé utile de définir pour chaque groupe de patients activés et non activés, des sous-groupes ayant pris de l'aspirine versus absence de prise d'aspirine, et de comparer les mesures de l'activation plaquettaire. Cependant, cela n'a pas été possible puisque la majorité des patients sont sous aspirine donc une taille d'échantillon plus grande aurait été souhaitable pour envisager une telle classification.

4. 2. 2. 1. 3 Le suivi des patients

Le suivi des patients durant les trois premiers mois après angioplastie et traitement antiplaquettaire a montré que la majorité des patients avec activation plaquettaire (n=16) ou sans activation plaquettaire (n=21) avant traitement et absence d'activation après administration de l'antiplaquettaire, n'ont pas développé de complications coronariennes à type d'AI ou d'IM. Parmi eux 5 patients ont développé ces complications après arrêt du traitement d'entretien au clopidogrel. Cependant, parmi

les patients qui n'ont pas présenté d'activation plaquettaire avant traitement mais seulement après thérapie antiplaquettaire (n=7), 4 de ces patients, 3 du groupe clopidogrel et un du groupe abciximab ont eu des complications à type d'AI, d'IM ou de MCS post-ICP alors qu'ils étaient sous traitement d'entretien au clopidogrel durant un mois après ICP. Parmi les 3 patients du groupe clopidogrel, un patient a eu une AI, deux jours après la dose charge de clopidogrel, un autre patient a eu une AI à deux reprises, dix et vingt jours après la dose charge. Le troisième a subi une MCS post-ICP quatorze jours après la dose charge. Parmi les quatre patients du groupe abciximab avec activation plaquettaire malgré traitement, un seul a présenté un IM deux mois après la dose charge d'abciximab et d'entretien au clopidogrel.

En d'autres termes, l'efficacité de la thérapie sur la fonction plaquettaire n'exclue pas pour certains patients le risque de récurrences. Dans ces cas, on peut parler de dose médicamenteuse insuffisante, de résistance au traitement ou de l'existence d'autres voies d'activation plaquettaire. Les autres patients ont développé des complications coronariennes après une longue période d'arrêt du traitement d'entretien donc en dehors de la couverture médicamenteuse. Les facteurs de risques, les mécanismes inflammatoires ou les différentes voies d'activation des plaquettes, peuvent être à l'origine de l'activation plaquettaire qui est responsable de l'évolution vers les complications coronariennes. En raison, des multiples variables intervenants dans ce contexte clinique, l'intérêt d'une étude approfondie avec une taille d'échantillon plus grande est justifié dans ces cas là.

4. 2. 2. 1. 4 Relation entre le MPC et l'expression de CD62P

L'activation plaquettaire se manifeste par des changements cellulaires, dont la diminution de la densité plaquettaire, correspondant à une libération du contenu des granules denses et alpha (CORASH, et al, 1977 ; MEZZANO et al, 1981) et l'expression de CD62P sur la surface membranaire des plaquettes (ABRAMS et SHATTIL 1991). L'expression de CD62P est citée dans la littérature comme marqueur de référence de l'activation des plaquettes (MICHELSON et al., 1996 ; MICHELSON et FURMAN, 1999 ; COULTER et al., 2000).

Dans la présente étude, nous avons montré que le MPC mesuré par l'ADVIA 120 et l'expression de CD62P exprimée en pourcentage, mesurée par la cytométrie de flux par immunofluorescence sont deux mesures de l'activation des plaquettes inversement proportionnelles. En d'autres termes, lorsque l'on observe une augmentation du pourcentage de CD62P qui indique un pourcentage de plaquettes activées, une diminution des valeurs du MPC traduit une baisse de la densité cellulaire des plaquettes observée lors de l'activation plaquettaire. De plus, les résultats ont montré une corrélation entre les deux mesures de l'activation plaquettaire, chez les volontaires sains dont le sang a été stimulé avec de la thrombine pour induire une activation plaquettaire *in vitro* ($r = 0.87$; $P < 0.0001$) et chez les patients coronariens sous antiplaquettaires ($r = - 0.82$; $P < 0.001$). Ces résultats rejoignent ceux des études de Chapman et collaborateurs et collaborateurs qui montrent que le MPC peut être utilisé

pour évaluer l'activation des plaquettes *in vivo* (CHAPMAN et al., 2003). De plus, il est mesuré par le système automatisé ADVIA 120 qui permet une analyse simple, rapide et directe de l'activation des plaquettes.

4. 2. 2. 2 Mesure de l'agrégation plaquettaire

La mesure de l'agrégation plaquettaire est nécessaire afin de montrer l'effet inhibiteur induit par la thérapie.

4. 2. 2. 2. 1 Effet des antiplaquettaires sur le taux de plaquettes

L'analyse du taux de plaquettes par l'ADVIA 120 a montré l'effet inhibiteur de l'abciximab. En effet, une augmentation immédiate du taux de plaquettes suite à l'administration de l'abciximab est conforme à l'effet inhibiteur de l'agrégation plaquettaire. En empêchant les plaquettes activées de s'agréger entre elles, celles-ci sont libérées dans la circulation et leur taux augmente. Réciproquement, les variations du taux de plaquettes sont insignifiantes et tardives pour le clopidogrel, inhibiteur d'une des voies de l'activation des plaquettes. Ce qui signifie que l'effet inhibiteur du clopidogrel n'influence pas de façon importante le taux de plaquettes. Ces résultats indiquent que l'effet inhibiteur de l'abciximab est en relation avec le décompte plaquettaire mesuré par l'ADVIA 120.

4. 2. 2. 2 Effet des antiplaquettaires sur l'agrégation des plaquettes

L'allongement du temps de formation du thrombus plaquettaire chez les patients du groupe abciximab s'explique par l'effet inhibiteur de l'abciximab, qui se traduit par un CEPI allongé vingt quatre heures après la prise du médicament chez la majorité des patients. Dans le groupe clopidogrel, il n'y a pas de différence significative avant et après la prise médicamenteuse, ce qui s'explique par l'effet inhibiteur du clopidogrel, seulement sur une des voies de l'activation des plaquettes, celle de l'ADP.

Le CEPI du reste des patients des deux groupes est non mesurable en raison des limites du système. En effet, la formation de thrombus plaquettaire, dans le système PFA-100 est affectée par des taux de plaquettes bas et/ou une activation des plaquettes, une anomalie du facteur de Von Willebrand plasmatique ; et par le traitement par l'aspirine.

4. 2. 2. 3 Relation entre le MPC et la protéine C réactive

La thrombose et l'inflammation sont des processus physiopathologiques étroitement liés. L'activation cellulaire implique des interactions complexes entre les plaquettes, les leucocytes et les cellules endothéliales. Les cellules inflammatoires locales peuvent produire et libérer des cytokines pouvant activer l'endothélium, augmentant le risque d'activation plaquettaire et la formation de thrombus coronarien.

Diverses circonstances cliniques et biologiques engendrent ou entretiennent le processus inflammatoire (LIBBY et al., 2002) qui sont:

- La dyslipidémie induit avec les LDL oxydées l'expression des cytokines, des molécules d'adhérence et d'autres facteurs de croissance.
- L'hypertension artérielle avec l'angiotensine II provoque la génération d'interleukine-6, de VCAM-1 et de MCP-1 avec un effet pro-inflammatoire au niveau de la paroi de l'intima du vaisseau.
- L'hyperglycémie contribue à majorer le stress oxydatif.
- L'obésité, avec une synthèse accrue d'interleukine-6 et de TNF-alpha au sein du tissu adipeux, stimule la réponse cellulaire.

La dyslipidémie, l'hypertension artérielle, l'obésité et l'hyperglycémie sont reconnus comme étant des facteurs de risques pouvant déclencher l'activation plaquettaire et par conséquent la thrombose coronarienne responsable des SCA. La majorité des patients de cette étude présentent dans leurs antécédents personnels un ou plusieurs de ces facteurs.

Dans cette étude, l'intérêt de mesurer la PCR est de d'étudier la relation possible entre un éventuel processus inflammatoire et l'activation plaquettaire dans la survenue de thrombose coronarienne dans une population de coronariens avant traitement antiplaquettaire. Récemment, des techniques utilisant des particules de latex ont permis d'augmenter la sensibilité du dosage de la PCR qui a ouvert une nouvelle voie de recherche et permis de corrélér les taux de PCR et le risque cardiovasculaire. Bien

que les valeurs basales de la PCR soient relativement stables chez le même individu, certains facteurs peuvent modifier son taux, comme une simple grippe ou un rhume. Des facteurs "non-inflammatoires" peuvent augmenter les taux de PCR. Il n'est donc pas aisé de fixer des valeurs seuils pour la PCR, ce qui accroît la difficulté à identifier des patients à risque. En effet, les sujets atteints de SCA, sont considérés à risque élevé s'ils ont des valeurs supérieures à 0,3 mg/dl, avant de subir la revascularisation coronarienne, et des valeurs de 0,5 mg/dl à 72 et 96 heures après revascularisation. Pour d'autres auteurs, une valeur de la PCR au-dessus de 5 mg/l a été considérée comme anormale. Dans cette étude, la valeur de la PCR de 4.28mg/l a permis de déterminer les patients coronariens avec des valeurs élevées. Les résultats du MPC et de la PCR vérifiés par le test du khi-deux montrent une relation significative entre les deux paramètres ($p < 0.01$). Parmi les patients avec activation plaquettaire avant traitement, la majorité, soit 81% ont un taux de PCR élevé par rapport aux patients sans activation plaquettaire où 29% seulement ont un taux de PCR élevé. Ce qui signifie que le pourcentage le plus élevé des patients à PCR élevée se retrouvent chez les patients avec activation plaquettaire avant thérapie, et qui sont donc considérés à risque de développer des événements thrombotiques. En effet, au moment du recrutement, tous les patients sont en phase aiguë du processus thrombotique puisqu'ils sont recrutés juste avant la dilatation par ICP et avant administration de la thérapie.

Ces données montrent que l'inflammation et l'activation plaquettaire sont deux processus possiblement associés et impliqués dans la survenue des SCA. Ces résultats sont appuyés par d'autres études cliniques. Sur un modèle de souris transgéniques ayant perdu le gène de régulation du métabolisme du cholestérol, Huo et collaborateurs a montré les liens étroits entre la thrombose et l'inflammation. Par l'intermédiaire de la P-sélectine située à la surface des plaquettes activées, les plaquettes forment des agrégats avec les monocytes et les leucocytes. Ces agrégats vont venir adhérer à la plaque d'athérome et entraîner l'aggravation des lésions en libérant des molécules inflammatoires (HUO et al., 2003). Par ailleurs, Les cellules inflammatoires locales peuvent produire et libérer des cytokines qui offrent des possibilités intéressantes d'activer l'endothélium, transformant ses propriétés normales antiadhésive et d'anticoagulant. Ces cytokines inflammatoires peuvent réduire la synthèse de matrice et augmenter sa dégradation, favorisant la rupture de plaque et déclencher l'activation des plaquettes. Aussi, la formation de thromboxane A2 ou de leucotriènes, à partir des phospholipides membranaires des plaquettes activées peuvent amplifier la réponse inflammatoire (ROSS, 1993 ; FALK et al., 1996 ; DAVIES, 1990). L'inflammation joue un rôle primordial tant dans la pathogenèse que dans la fragilisation de la plaque et les événements thrombo-occlusifs qui en découlent. La réponse à cette agression par les cellules humorales et immunitaires se traduit par l'expression de marqueurs de l'inflammation, dont la PCR, devenue grâce aux techniques ultrasensibles un révélateur d'un état inflammatoire à bas bruit d'une très

haute sensibilité. Elle montre une très forte corrélation avec les événements futurs cardiovasculaires, indépendante des autres facteurs de risque classiquement connus (BENOIT, 2002). En démontrant l'association entre la PCR et la maladie coronarienne, cette étude nous donne des pistes intéressantes de futures recherches.

4. 2. 2. 4 Relation entre le MPC et la troponine I

Des études comme celle de Fuchs et collaborateurs ont montré chez les patients avec SCA et thrombus coronarien à l'examen angiographique, des lésions coronariennes complexes et diffuses et une troponine I élevée à l'admission (FUCHS et al., 2002). Dans cette étude, nous n'avons retrouvé aucune relation entre le marqueur de l'activation plaquettaire, le MPC et le marqueur des dommages myocardiques, la troponine I. Nous n'avons pas considéré ni établi de liens entre l'importance des lésions coronariennes à l'examen angiographique chez nos patients avec activation plaquettaire et la troponine I. D'autres part, la majorité des patients de l'étude a été sollicitée et recrutée quelques jours après leur admission à l'hôpital et a reçu un traitement probablement trop tard pour interpréter les résultats de troponine I. Il faut savoir aussi que des tests de troponine I négatifs n'excluent pas le risque d'ischémie myocardique confirmée à l'électrocardiogramme. D'autre part, ces patients ont été recrutés pour une angioplastie élective et non dans le cadre de l'urgence, en d'autre terme durant une phase qui a dépassé le stade aigu de la maladie coronarienne.

4. 3 Forces et limites de l'étude

Dans cette étude, les instruments de mesure sont manipulés par une seule personne, cela représente une des forces de l'étude et permet de diminuer la variabilité associée à l'évaluateur, aussi, on associe un entraînement intense du manipulateur à une bonne calibration de l'appareil. D'autre part, le paramètre plaquettaire à l'étude, MPC, est mesuré par un instrument de mesure, le système automatisé ADVIA 120 d'utilisation simple et pratique et cela constitue en soi, une force de l'étude. En effet, il permet de quantifier directement l'activation plaquettaire sans trop manipuler les plaquettes sanguines, comparativement à la méthode de référence, la cytométrie de flux par immunofluorescence qui est inaccessible en routine et nécessite beaucoup la manipulation des plaquettes. D'autre part, l'absence de groupe contrôle et le fait que chaque sujet soit son propre témoin, réduit la possibilité d'avoir un biais de sélection.

Quand aux limites de l'étude, sont que nous ne disposons pas d'études préliminaires car cette étude est nouvelle et la difficulté de recrutement des patients en salle d'hémodynamie en raison de l'état émotionnel du patient avant la procédure de dilatation par ICP. La sélection des patients en se basant sur les critères d'inclusion et d'exclusion a permis une sélection rapide mais a limité notre taille d'échantillon, pour la simple raison que certains patients ont eu les deux antiplaquettaires, clopidogrel et abciximab en association durant l'ICP. Dans ce cas, on ne peut pas évaluer l'efficacité

des inhibiteurs de la fonction plaquettaire, puisque les voies d'inhibition sont différentes.

Tous les patients prennent de l'aspirine et/ou de l'héparine, car la majorité ont des antécédents coronariens et ces médicaments sont connus pour interférer avec les fonctions plaquettaires. Certains ont pris du clopidogrel pendant un mois avant la période de recrutement dans notre projet ou deux ou trois jours avant l'angioplastie.

Idéalement, il serait plus intéressant de pouvoir déterminer pour chaque groupe de patients activés et non activés, des sous-groupes ayant pris de l'aspirine et ceux sans aspirine, ou des patients avec SCA sans antécédents personnels d'événements coronariens.

4. 4 Retombées anticipées

Le vingtième siècle est et sera un siècle riche en découvertes et en espoir, pour les patients atteints de SCA. Ces syndromes très fréquents inquiètent encore beaucoup les cliniciens. De nouvelles percées de la science cardiovasculaire contribuent à améliorer davantage la compréhension des mécanismes impliqués dans la survenue de la thrombose coronarienne. Il devient de plus en plus évident que la présence d'un pourcentage élevé de plaquettes activées est associé au développement de la thrombose coronarienne et que la contribution du processus inflammatoire est importante. Les écrits scientifiques recensés soulèvent des limites importantes au

niveau des tests utilisés explorant la fonction plaquettaire. Les instruments de mesure doivent être accessibles en pratique clinique et minimiser la manipulation des plaquettes sanguines, afin d'avoir une meilleure évaluation de l'activation plaquettaire *in vivo*. L'intervention de plusieurs variables aussi bien dans les mécanismes impliqués dans la survenue de la thrombose coronarienne que dans les mécanismes d'activation des plaquettes, montre que l'on ne peut pas tous les contrôler. La relation entre l'indice de l'activation plaquettaire, le MPC, et la protéine de l'inflammation, la PCR, orientent la prise en charge thérapeutique des SCA peut-être vers une association médicamenteuse bénéfique comme l'association aux antiplaquettaires d'un traitement inflammatoire.

CONCLUSION

Il est évident que malgré une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques responsables de la survenue de thrombose coronarienne et de l'implication directe des plaquettes sanguines, on se rend compte qu'il n'y a pas de moyens simple et accessible en routine pour évaluer directement l'activation plaquettaire, d'autant plus que les plaquettes sanguines sont difficilement manipulables. Donc, il est nécessaire de prévenir l'activation des plaquettes *in vitro* induites lors des manipulations expérimentales, depuis le choix de l'anticoagulant sur lequel est prélevé le sang à analyser, jusqu'à l'instrument de mesure qui minimiserait le plus que possible la manipulation des plaquettes ainsi que le paramètre plaquettaire qui évaluerait directement l'activation des plaquettes. Cette étude clinique est la première à évaluer l'activation plaquettaire en utilisant la mesure de la densité plaquettaire, exprimée par le MPC, mesuré par le système hématologique automatisé l'ADVIA 120, dans une population de coronariens sous antiplaquettaires. L'intérêt de l'étude est avant tout d'établir des conditions de mesure des plaquettes sanguines et par la suite de mesurer l'activation plaquettaire basale et d'évaluer l'effet d'inhibiteurs tel que le clopidogrel et l'abciximab sur la fonction plaquettaire.

L'EDTA est un anticoagulant disponible au laboratoire qui donne aux plaquettes une stabilité acceptable, mesurée dans l'intervalle d'une heure. Les résultats de l'étude indiquent que le CTAD permet une meilleure prévention de l'activation plaquettaire *in vitro*, et l'utilisation d'un système automatisé ne nécessitant pas la manipulation des plaquettes, tel que l'ADVIA 120, nous permettent aisément de pouvoir déterminer correctement l'activation plaquettaire *in vivo*. D'autres études sont nécessaires pour valider l'utilisation du CTAD.

Cette étude a montré une corrélation entre les deux mesures de l'activation plaquettaire, l'expression de la P-sélectine qui est une mesure de référence et la densité des plaquettes exprimée par le MPC. L'identification de deux groupes de patients, un premier groupe avec activation plaquettaire avant traitement qui a répondu aux médicaments par l'inhibition de l'activation des plaquettes et un deuxième groupe sans activation plaquettaire, avant traitement, qui après traitement, n'ont présenté aucun changement de l'état des plaquettes, à l'exception de certains patients, chez qui on a observé une activation plaquettaire, malgré le traitement.

Ces résultats ont mis en évidence la capacité du MPC à mesurer l'activation plaquettaire et à détecter l'hétérogénéité du comportement des plaquettes chez les patients coronariens. La présence d'une activation des plaquettes malgré l'effet inhibiteur des médicaments, témoigne probablement d'une résistance au traitement antiplaquettaire. D'autre part, il a été démontré que l'angioplastie est capable de déclencher l'activation

des plaquettes, d'où l'intérêt de prescrire des antiplaquettaires durant la procédure. Toutefois, l'absence d'activation plaquettaire avant et après traitement chez certains patients coronariens peut remettre en cause l'intérêt de prescrire ces antiplaquettaires. Mais, le risque d'avoir une activation plaquettaire après angioplastie et cela malgré l'effet inhibiteur des antiplaquettaires soulève l'intérêt d'utiliser le MPC pour identifier ces patients à risque de développer des complications thrombotiques dû à la persistance de l'activation plaquettaire, de maintenir et de surveiller l'efficacité des antiplaquettaires et peut-être d'ajuster les doses et/ou prolonger la durée du traitement. Ainsi, on pourrait avoir une meilleure appréciation du rapport risque/bénéfice.

Par ailleurs, la relation établie entre l'activation des plaquettes et le marqueur de l'inflammation, la PCR permet une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques des SCA. Ce résultat soulève la possibilité d'envisager peut-être la combinaison thérapeutique d'anti-inflammatoires, aux inhibiteurs plaquettaires.

Finalement, cette étude exploratoire a été réalisée auprès d'une population bien définie, soit des patients portant le diagnostic d'AI ou d'IM, subissant une ICP sous antiplaquettaires, clopidogrel ou abciximab durant l'angioplastie. Les résultats ne peuvent donc être généralisés aux autres populations de coronariens qui n'ont pas subi l'ICP et qui ne sont pas sous antiplaquettaires. Pour cela, le MPC devra être validé auprès d'études futures de plus grande taille d'échantillon afin de pouvoir assurer une étude du suivi et de déterminer la valeur pronostique du MPC, de contrôler des décisions cliniques dans les

SCA et dans d'autres contextes pathologiques associés à un état d'activation plaquettaire.
Cette recherche est un premier pas vers une meilleure prise en charge des patients coronariens.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr Andrew Grant pour m'avoir accueilli dans son service et malgré mon inexpérience en recherche, a su me guider rapidement et adéquatement pour me permettre de réaliser des travaux intéressants dont celui qui fait l'objet du présent mémoire. Je remercie le Dr Charaf Ahnadi pour son aide précieuse lors de l'apprentissage des diverses manipulations et son support constant lors de l'évaluation des résultats. Je remercie également mon codirecteur, le Dr Jean Pierre Tétrault qui, par ses conseils judicieux a supervisé mes travaux et grâce à son expérience en méthodologie a su guider mes premiers pas en recherche clinique.

Je dois aussi souligner l'effort et le soutien du personnel du centre de recherche en évaluation et diagnostic qui m'a permis de m'intégrer facilement, l'assistante de recherche Véronique Poisson, les techniciens Geneviève Dumont, Tu Yang et notamment Jean François Lachance qui a eu la gentillesse de me consacrer le temps qu'il fallait pour m'expliquer les principes de l'instrument de mesure ADVIA 120.

Je remercie l'équipe informatique de ces précieux conseils, surtout Dany Drapeau, qui par son expertise en informatique et sa générosité a participé aux diverses étapes de l'élaboration du mémoire.

Je remercie l'Université de Sherbrooke et plus particulièrement les professeurs de la maîtrise en sciences cliniques de la faculté de médecine, sans oublier Mme Danielle

Lacroix pour sa patience et son sourire encourageant toujours présent.

Je remercie toute l'équipe du service d'hémodynamie, qui ont contribué de près ou de loin dans la réalisation de ce projet, sans oublier de souligner la contribution des patients ayant accepté de participer à l'étude, sans eux rien n'aurait été possible.

Je remercie aussi mes parents, bien qu'à des milliers de kilomètres, pour leur support constant et leur amour inconditionnel.

Je remercie mon époux, Tayeb, d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenu, mes enfants Rafik et Tarik, pour leur amour.

Je remercie également tous mes amis (e), qui m'ont soutenu, tout au long de mon parcours.

Finalement je remercie les membres du jury :

Le Dr Alain Vanasse

Le Dr Michel Nguyen

Le Dr Yahie Merhi

RÉFÉRENCES

- **Abrams C, Shattil S.** Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. *Thromb Haemost.* (1991) ; 65:467-473.
- **Ahnadi CE, Chapman S, Lépine M, Okrongly D, Pujol-Moix N, Hernández A, Boughrassa F and Grant A.** Assessment of platelet activation in several different anticoagulants by the ADVIA 120 Hematology System, fluorescence flow cytometry, and electron microscopy. *Throm Haemost.* (2003) ; 90(5):940-8.
- **Andrews RK, Lopez JA, Berndt MC.** Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol.* (1997) ; 29:91–105.
- **Antman EM, Tanasijevic MJ, Thompson B, Schactman M, McCabe CH, Cannon CP, Fischer GA, Fung AY, Thompson C, Wynbenga, Braunwald E.** Cardiac-specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes. *N. Engl. J Med.* (1996) ; 335:1342-9
- **Arber N, Berliner S, Pras E, et al.** Heterotypic leukocyte aggregation in the peripheral blood of patients with leukemia, inflammation and stress. *Nouv Rev Fr Hematol.* (1991) ; 33:251–255.
- **Arthaud M.** Marqueurs biologiques de l'angine de poitrine et de l'infarctus du myocarde. *Biologiste et Praticien.* (1997) ; 110:2,19-34.
- **Assemen P, Bauchart JJ, Delomez M, Thery C.** Marqueurs biologiques de l'ischémie : intérêt dans l'algorithme de prise en charge des douleurs thoraciques spontanées. *Réanim Urgences.* (1999) ; 8:134-9.
- **Ault KA, Cannon, CP, Mitchell J, McCahan J, Tracy RP, Novotny WF, et al.** Platelet activation in patients after an acute coronary syndrome : results from the TIMI-12 trial : Thrombolysis in myocardial infarction. *J am Coll Cardiol.* (1999) ; 33(3):634-639.
- **Azar RR, McKay RG, Kiernan FJ, Seecharran B, Feng YJ, Fram DB, Wu AHB, Waters DD :** Coronary Angioplasty Induces a Systemic Inflammatory Response. *The American Journal of Cardiology.* (1997) ; 80(11):1476-1478.

- **Badimon L, Badimon JJ, Fuster V.** Pathogenesis of thrombosis. In :Vestraete M, FusterV, Topol EJ, eds. *Cardiovascular Thrombosis*. (1998) ; 23-44.
- **Barnathan ES, Schwartz JS, Taylor L, et al.** Aspirin and dipyridamole in the prevention of acute coronary thrombosis complicating coronary angioplasty. *Circulation*. (1987) ; 76:125-34.
- **Baumgartner HR, Muggli R :** Adhesion and aggregation : Morphological demonstration and quantitation in vivo and in vitro. In : Gordon JL (ed) : *Platelets in biology and pathology*. Amsterdam Elsevier, (1976).
- **Bauters C, Lablanche JM, Renaud N, et al.** Morphological changes after percutaneous transluminal coronary angioplasty of unstable plaques: insights from serial angioscopic follow-up. *Eur Heart J*. (1996) ; 17:1554–1559.
- **Becker RC, Tracey RP, Bovill EG, Mann KG, Ault K.** The clinical use of flow cytometry for assessing platelet activation in acute coronary syndromes. *Coron Artery Dis*. (1994) ; 5:339-345.
- **Ben Amor MA, Najjar MF, Machghoul S, Kallel R, zouaghi H.** Apport de la myoglobine dans le diagnostic de l'infarctus du myocarde. *L'Eurobiologiste*. (1993) ; 27:206,247-250.
- **Benoit MO.** Protéine C-réactive et prévention cardiovasculaire : *Sang Thrombose Vaisseaux*. (2002) ; 14(3) : 172-8, Mini-revues.
- **Benson RL.** The present status of coronary arterial disease. *Arch Pathol Lab Med*. (1926) ; 876-916.
- **Berger G, Hartwell DW, Wagner DD.** P-selectin and platelet clearance. *Blood*. (1998) ; 92:4446–4452.
- **Berk BC, Weintraub WS, Alexander RW.** Elevation of C-reactive protein in 'active' coronary artery disease. *Am J Cardiol*. (1990) ; 65:168-72.
- **Berliner JA, et al.** Atheroclerosis : Basic Mechanism. Oxydation, Inflammation, and Genetics. *Circulation*. (1995) ; 91:2488-96.
- **Berndt MC, Ward CM, De Luca M, et al.** The molecular mechanism of platelet adhesion. *Aust N Z J Med*. (1995) ; 25:822–830.

- **Bertrand ME, Simoons ML, Fox KAA, Wallentin LC, Hamm CW, McFadden E, De Feyter PJ, Specchia G, Ruzyllo W.** Management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. Recommendation of the Task force of the European society of cardiology. *European Heart Journal*. (2002) ; 23:1809-1840.

- **Bertrand ME, Chair ML, Simoons KA, Fox A, Walletin LC, Hamm CW, et al.** Management of acute coronary syndromes : acute coronary syndromes without persistent ST segment elevation. Recommendation of the Task force of the European society of cardiology. *European Heart Journal*. (2000) ; 21 :1406-32.

- **Biasucci LM, Liuzzo G, Grillo RL, Caligiuri G, Rebuzzi AG, Buffon A, Summaria F, Ginnetti F, Fadda G, Maseri A.** Elevated levels of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability. *Circulation*. (1999) ; 99(7):855-60.

- **Bihour C, Durrieu-Jais C, Besse P, Nurden P, Nurden AT.** Flow cytometry reveals activated GP IIb-IIIa complexes on platelets from patients undergoing thrombolytic therapy after acute myocardial infarction. *Blood Coagul Fibrinolysis*. (1995) ; 6:395-410.

- **Bihour C, Durrieu-Jais C, Macchi L, Poujol C, Coste P, Besse P, Nurden P, Nurden A.** Expression of markers of platelet activation and the interpatient variation in response to abciximab. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. (1999) ; 19(2):212-9.

- **Bodor GS.** Cardiac troponin-I: a highly specific biochemical marker for myocardial infarction. *J. Clin. Immunoassay*. (1994) ; 17:1, 40-44.

- **Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM.** Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIbIIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), (alpha)v(beta)3 integrin, and GPIb(alpha). *J Exp Med*. (1998) ; 187:329-39.

- **Braunwald E, Sonnenblick EH, Ross J.** Mechanism of cardiac contraction and relaxation. In : *Heart disease*. 4 th ed. Philadelphia : Braunwald E, WB Sanders compagny. (1992) ; 335-92.

- **British Society for Haematology. BCSH, Haemostasis and Thrombosis. Task Force.** Guidelines on platelet function testing. *J Clin pathol*. (1988) ; 41:1322-30.

- **Brummitt DR, Barker HF.** The determination of a reference range for new platelet parameters produced by the Bayer ADVIA 120 full blood count analyser. *Clin. Lab. Haem.* (2000) ; 22:103-107).
- **Buffon A, Liuzzo G, Biasucci LM, et al.** Preprocedural serum levels of C reactive protein predict early complications and late restenosis after coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol.* (1999) ; 34:1512-1521.
- **Cahill MR, Macey MG, Newland AC.** Platelet surface activation antigen expression at baseline and during elective angioplasty in patients with mild to moderate coronary artery disease. *Blood Coagul Fibrinol.* (1996) ; 7:165-168.
- **Camoin-Jau L, Sampol J.** Les nouveaux antiplaquettaires, Laboratoire d'Hématologie, Hôpital de la Conception, Marseille. (2000).
- **Cannon CP, McCabe CH, Stone PH, Schactman M, Thompson B, Theroux P, Gibson RS, Feldman T, Kleiman NS, Tofler GH, Muller JE, Chaitman BR, Braunwald E.** Circadian variation in the onset of unstable angina and non-Q-wave acute myocardial infarction (the TIMI III Registry and TIMI IIIB). *American Journal of Cardiology.* (1997) ; 79(3):253-8.
- **Cayatte AJ, Palacino JJ, Horten K et al.** Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb.* (1994) ; 14:753-759.
- **Cermak J, Key NS, Bach RR, Balla J, Jacob HS, Vercellotti GM.** C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor. *Blood.* (1993) ; 82:513-20.
- **Chapelle JP.** Marqueurs biochimiques de l'infarctus du myocarde. *Feuillets de Biologie.* (1993) ; 34:193, 25-35.
- **Chapman ES, Sorette M, Hetherington E, Zelmanovic Z, Kling G, Dugailliez J, Pujol-Moix N, Okrongly D.** A rapid, automated flow cytometric method to measure activated degranulated platelets by density determination. *Thrombosis and Haemostasis.* (2003) ; 89: 1004-1015.
- **Chapman I.** Morphogenesis of occluding coronary artery thrombosis. *Arch Pathol Lab Med.* (1965) ; 80:256-261.
- **Chesebro JH, Lam JYT, Badimon L, Fuster V.** Restenosis after arterial angioplasty: a hemorheologic response to injury. *Am J Cardiol.* (1987) ; 60:10B-16B.

- **Chesebro JH, Rauch U, Fuster V, et al.** Pathogenesis of thrombosis in coronary artery disease. *Haemostasis*. (1997) ; 27(suppl 1): 12–18.
- **Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM.** Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. *Lab Invest*. (1983) ; 49:327-333.
- **Cohen.** *Cardiologie et pathologie vasculaire*. Paris : ESTEM, (1997).
- **Coller BS.** Blockade of platelet GP IIB/IIIa receptors as an antithrombotic strategy. *Circulation*. (1995) ; 92(9):2373-2380.
- **Corash L, Tan H, Gralnick H.** Heterogeneity of human whole blood platelet subpopulations. I. relationship between buoyant density, cell volume and ultrastructure. *Blood*. (1977) ; 49:71-87.
- **Coulter SA, Cannon CP, Kenneth AA, Antman EM, Van de Werf F, Adgey AAJ, Gibson MC, Giugliano RP, Mascelli MA, Scherer J, Barnathan ES, Braunwald E, Kleiman NS.** for the TIMI 14 Platelet Substudy Investigators. High Levels of platelet Inhibition With Abciximab Despite Heightened Platelet Activation and Aggregation During Thrombolysis for Acute Myocardial infarction. *Circulation*. (2000) ; 101(23):2690-2695.
- **Cramer EM.** Megakaryocyte structure and function. *Curr Opin Hematol*. (1999) ; 6: 354-61.
- **Cushing SD, Fogelmann AM.** Monocytes may amplify their recruitment into inflammatory lesions by inducing monocyte chemotactic protein. *Arterioscler Thromb*. (1992) ; 12 : 78-82.
- **Davies MJ, Thomas A.** Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death. *N Engl J Med*. (1984) ; 310 :1137-1140. Abstract.
- **Davies MJ, Thomas AC.** Plaque fissuring : the cause of acute myocardial infarction. Sudden ischaemic death. And crescendo angina. *Br heart J*. (1985) ; 53:363-373.
- **Davies MJ, Thomas AC, Knapman PA, Hangartner JR.** Intramyocardial platelet aggregation in patients with unstable angina suffering sudden ischemic cardiac death. *Circulation*. (1986) ; 73:418-27.
- **Davies MJ.** A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease. *Circulation*. (1990) ; 82:Suppl II:II-38-II-46.

- **Davies MJ, Richardson PJ, Woolf N Katz DR, Mann J.** Risk of thrombosis in human atherosclerotic palques : role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J.* (1993) ; 69:377-81.
- **Davies M.** The composition of coronary artery plaque. *N Engl J Med.* (1997) ; 336:1312-13.).
- **De Caterina R, Lanza M, Manca G, Buti Strata G, Maffei S, Salvatore L.** Bleeding time and bleeding: an analysis of the relationship of the bleeding time test with parameters of surgical bleeding. *Blood.* (1994) ; 84:3363-70.
- **De Feyter PJ, Van den Brand M, Jaarman GJ, Van Domburg R, Serruys PW, Suryapranata H.** Acute coronary artery occlusion during and after percutaneous transluminal coronary angioplasty: frequency, prediction, clinical course, management, and follow-up. *Circulation.* (1991) ; 83:927-936.
- **Delanghe JR, De Buyzere ML, De Scheerder IK, Cluyse LP, Thierens HM.** Characteristics of creatine release during acute myocardial infarction, unstable angina, and cardiac surgery. *Clin. Chem.* (1995) ; 41:6, 928-933.
- **Del Zoppo GJ.** The role of platelets in ischemic stroke. *Neurology.* (1998) ; 51:S9–S14.
- **Detre K, Holmes D, Holubkov R, Cowley M, Bourassa G, Faxon D, Dorros G, Bentivoglio L, Kent K, Myler R.** Incidence and consequences of periprocedural occlusion. *Circulation.* (1990) ; 82:739-750.
- **De Wood MA, Spores J, Notske R, Mouser LT, Burroughs R, Golden MS, Lang HT.** Prevalence of total coronary occlusion during the early hours of transluminal myocardial infarction. *N Engl J Med.* (1980) ; 303:897-902. Abstract.
- **Durrieu-Jais C, Poujol C, Bihour C, Nurden P, Nurden AT.** Inhibiteurs des glycoprotéines plaquettaires IIb-IIIa : utilisation clinique et effets physiopathologiques associés. *Hématologie.* (2000) ; 6 (5):360-8, Revues.
- **Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, et al.** Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation.* (2002) ; 105:1650–1655.
- **Elalamy I.** Nécessité et moyens de surveillance biologique du traitement par des antagonistes des récepteurs GPIIb-IIIa plaquettaires. *Hématologie.* (1999) ; 5 (5):367-75, revues et mini-revues.

- **Ellis SG, Roubin GS, King SB III, Douglas JS, Weintraub WS, Thomas RG, Cox WR.** Angiographic and clinical predictors of acute closure after native vessel coronary angioplasty. *Circulation.* (1988) ; 77:372-379.
- **Fabunmi RP et al.** Expression of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-3 in human atheroma and regulation in lesion-associated cells. *Circ. Res.* (1998) ; 83 : 270-8.
- **Falk E, Shah PK, Fuster V.** Coronary plaque disruption. *Circulation.* (1995) ; 92:657-71.
- **Falk E, Shah PK, Fuster V.** Pathogenesis of plaque disruption. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease.* (1996) ; 2:492-510.
- **Feohtistov IA, Paul S, Hollister AS, Robertson D, Biaggioni I.** Role of cyclic AMP in adenosine inhibition of intracellular calcium rise in human platelets. Comparison of adenosine effects on thrombin- and epinephrine-induced platelet stimulation. *Am J hypertension.* (1992) ; 5:147S-153S.
- **Fernandez-Ortiz A, Badimon JJ, Falk E, Fuster V, Chesebro JH, Badimon L.** Thrombogenicity of human arterial wall : implication for vascular interventions. *J Am Coll Cardiol.* (1994) ; 23:1562-1569.
- **Fisch C.** The clinical electrocardiogram : sensitivity and specificity. *J Am Coll Cardiol.* (1997) ; 6(3) : 71-5.
- **Fichtlscherer S, Rosenberger G, Walter G, Breuer S, Dimmeler S, Zeiher AM.** Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *Circulation.* (2000) ; 102:1000-6.
- **Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, Detre K, Veltri L, Ricci D, Nobuyoshi M.** A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. *N Engl J Med.* (1994) ; 331:496-501.
- **Fisher G, Zelmanovic D, Shapiro P, Greenbaum A, Kunicka JE.** Evaluation of the two dimensional platelet method on the ADVIA 120 TM hematology system. In: First International Bayer Diagnostics Central Laboratory Symposium. Wilton, Conn: Chase Medical Publishers; (1997):46.
- **Fitzgerald DJ, Roy L, Catella F, Fitzgerald GA.** Platelet activation in unstable coronary disease. *N Eng J med.* (1986) ; 315(16):983-989.

- **Fitzgerald DJ, Catella F, Roy L, Fitzgerald GA.** Marked platelet activation in vivo after intravenous streptokinase in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. (1988) ; 77:142-150.
- **Folts JD, Crowell EB Jr, Rowe GG.** Platelet aggregation in partially obstructed vessels and its elimination with aspirin. *Circulation*. (1976) ; 54:365-370. Abstract.
- **Fondation des maladies du cœur du Canada, le nouveau visage des maladies cardiovasculaires et des accidents vasculaires cérébraux au Canada.** Ottawa, Canada (1999) (Source : *FASTRAK II, Hoffman-La Roche Ltée*).
- **Forrester JS, Fishbein M, Helfant R, Fagin J.** A paradigm for restenosis based on cell biology: clues for the development of new preventive therapies. *J Am Coll Cardiol*. (1991) ; 17:758-769.
- **Francis JL, Francis D, Larson L, Helms E & Garcia M.** Can the platelet function analyser (PFA) -100 test substitute for the template bleeding time in routine clinical practice. *Platelets*. (1999) ; 10:132-136.
- **Frishman WH, Burns B, Atac B, Alturk N, Altajar B, Lerrick K.** Novel antiplatelet therapies for treatment of patients with ischemic heart disease :inhibitors of the platelet glycoprotein IIb/IIIa integrin receptor (Review) . *Am Heart J*. (1995) ; 130 (4):877-892.
- **Frostegard J, Huang YH, Ronnelid J, Schafer-Elinder L.** Platelet-Activating Factor and Oxidized LDL induce activation by a common mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. (1997) ; 17:936-8.
- **Fuchs S, Stabile E, Mintz GS, Pappas CK, Maehara A, Gruberg L, Satler LF, Pichard AD, Kent KM, Weissman NJ.** Intravascular ultrasound findings in patients with acute coronary syndromes with and without elevated troponin I level. *American Journal of Cardiology*. (2002) ; 89 (9):1111-3.
- **Furman MI, Benoit SE, Barnard MR, Valeri CR, Borbone ML, Becker RC, Hechtman HB, Michelson AD.** Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. *Journal of the American College of cardiology*. (1998) ; 31 (2):352-8,
- **Fuster V, Badimon L, Cohen M, Ambrose JA, Badimon JJ, Chesebro J.** Insights into pathogenesis of acute ischemic syndromes. *Circulation*. (1988) ; 77:1213-20.

- **Fuster V, Badimon L, Badimon J, Chesebro J.** The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* (1992) ; 326:242–250, 310–318.
- **Fuster V.** Mechanisms leading to myocardial infarction : insights from studies of vascular biology. *Circulation.* (1994) ; 90:2126-46.
- **Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P.** Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* (1994) ; 94:2493-503.
- **Gaspardone A, Crea F, Versaci F, et al.** Predictive value of C-reactive protein after successful coronary-artery stenting in patients with stable angina. *Am J Cardiol.* (1998) ; 82:515–518.
- **Gawaz M, Ott I, Neumann FJ.** Surface expression of platelet membrane glycoproteins following coronary stenting: effect on subacute stent thrombosis? *Circulation.* (1994) ; 90(suppl I):I-552. Abstract.
- **Gawaz, M, Neumann F J, Ott I, May A, Rudiger S, Schomig A.** Changes in membrane glycoproteins of circulating platelets after coronary stent implantation. *Heart.* (1996) ; 76(2):166-172.
- **Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, May A, Schomig A :** Platelet activation and coronary stent implantation : effect of thrombotic therapy. *Circulation.* (1996) ; 94:279-285.
- **Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, May A, Rudiger S, Schomig A :** Role of activation-dependent platelet membrane glycoproteins in development of subacute occlusive coronary stent thrombosis. *Coron Artery Dis.* (1997) ; 8 :121-128.
- **Gawaz M, Seyfarth M, Muller I, et al.** Comparison of effects of clopidogrel versus ticlopidine on platelet function in patients undergoing coronary stent placement. *Am J Cardiol.* (2001) ; 87 :332-6.
- **George JN, Thio LL, Morgan RK:** Quantitative analysis of platelet membrane glycoproteins: effet of platelet washing procedures and isolation of platelet density subpopulations. *Thromb Res.* (1981) ; 23:69-77.
- **Giles H, Smith REA, Martin JF.** Platelet glycoprotein IIb-IIIa and size are increased in acute myocardial infarction. *Eur J Clin Invest.* (1994) ; 24:69-72.

- **Golanski J, Pietrucha T, Baj Z, Greger J, Watala C.** Molecular insights into the anticoagulant-induced spontaneous activation of platelets in whole blood—various anticoagulants are not equal. *Thromb Res.* (1996) ; 83:199-216.
- **Gold HK, Gimple L, Yasuda T, Leinbach R, Werner W, Holt R, Jordan R, Berger H, Collen D, Collier BS.** Pharmacodynamic study of F(ab')₂ fragments of murine monoclonal antibody 7E3 directed against human platelet glycoprotein IIb/IIIa, in patients with unstable angina pectoris. *J Clin Invest.* (1990) ; 86:651-659.
- **Goldberg ID, Stemerman MB.** Vascular permeation of platelet factor-4 after endothelial injury. *Science.* (1980) ; 209:611-612.
- **Goldberg RG, Mooradd M, Gurwitz JH, Rogers WJ, French WJ, Barron HV.** Impact of time to treatment with tissue plasminogen activator on morbidity and mortality following acute myocardial infarction (the Second National Registry of Myocardial Infarction). *Am j Cardiol.* (1998) ; 82:259-64.
- **Gottsauner-Wolf M, Zasmata G, Hornykewycz S, Nikfardjam M, Stepan E, Wexberg P, Zorn G, Glogar D, Probst P, Maurer G, Huber K.** Plasma levels of C-reactive protein after coronary stent implantation. *European Heart Journal.* (2000) ; 21(14):1152-8.
- **Gresele P, Arnout J, Deckmyn H, Vermeylen J.** Mechanism of the anti-platelet action of dipyridamole in whole blood: Modulation of adenosine concentration and activity. *Thrombosis Haemostasis.* (1986) ; 55: 12-17.
- **Gruel Y, Boizard B, Daffos F, Forestier F, Caen J, Wautier JL.** Determination of platelets antigens and glycoproteins in the human fetus. *Blood.* (1986) ; 68 (2):488-492.
- **Guidelines 2000 for cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care.** Part 7: The Era of Reperfusion : Section 1: Acute Coronary Syndromes (Acute Myocardial Infarction). *Circulation.* (2000) ; 102 (Suppl I):172-203.
- **Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL, O'Connor CM.** Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation.* (2003) ; 107 (23):2908-13.
- **Hamm CW, Goldmann BU, Heeschen C, Kreymann G, Berger J, Meinertz T.** Emergency room triage of patients with acute chest pain by means of rapid testing for cardiac troponin T or troponin I. *N Engl J Med.* (1997) ; 337(23):1648-53.

- **Hamm CW, Braunwald A.** classification of unstable angina revisited. *Circulation*. (2000) ; 102:118-22.
- **Hamm CW, Giannitsis E, Katus HA.** Cardiac troponin elevations in patients without acute coronary syndrome. *Circulation*. (2002) ; 106: 2871–2.
- **Hampton JR.** The potential of thrombolysis in the treatment of thrombotic coronary occlusion. *Circulation*. (1969) ; 39 (suppl IV):IV-231-IV-237.
- **Harker LA.** Role of platelets and thrombosis in mechanisms of acute occlusion and restenosis after angioplasty. *Am J Cardiol*. (1987) ; 60:20B-28B.
- **Haude M, Erbel R, Issa H, Straub U, Rupprecht HJ, Treese N, et al.** Subacute thrombotic complications after intracoronary implantation of Palmaz-Schatz stents. *Am Heart J*. (1993) ; 126:15-22.
- **Haverkate F, Thompson SG, Ipyke SDM, Gallimore JR, Pepys MB, for The European Concerted Action On Thrombosis And Disabilities Angina Pectoris Study Group** (1997) Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. *Lancet*. (1997) ; 349:462-66.
- **Hawiger J.** Platelet secretory pathways: an overview. *Methods Enzymol*. (1989) ; 169:191-195.
- **Hawinger J.** Adhesive interactions of blood cells and the vascular wall. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds.: *Basic Principles and Clinical Practice*. 3rd ed. Philadelphia, Pa: JB Lippincott; *Hemostasis and Thrombosis*. (1994) ; 762-796.
- **Heeschen C, Hamm CW, Goldmann B, Deu A, Langenbrink L, White HD.** Troponin concentrations for stratification of patients with acute coronary syndromes in relation to therapeutic efficacy of tirofiban. PRISM Study Investigators. Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management. *Lancet*. (1999) ; 354:1757-62.
- **Hennen G.** Biochimie humaine. Introduction biochimique à la médecine interne. Paris, De Boeck université, (1996).
- **Herrick JB.** Clinical features of sudden obstruction of the coronary arteries. *JAMA*. (1912) ; 59:2015-2020.

- **Herrmann HC, Buchbinder M, Clemen MW, Fischman D, Goldberg S, Leon MB, et al.** Emergent use of balloon-expandable coronary artery stenting for failed percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Circulation*. (1992) ; 86:812-9.
- **Hezard N, Metz D, Simon G, Droulle C, Daliphard S, Potron G.** Platelet activation in cardiology : methods, indications and therapeutic perspectives. *Journal des Maladies Vasculaires*. (1999) ; 24(4):288-93.
- **Hollman J, Gruentzig AR, Douglas JS, King SB III, Ischinger T, Meier B.** Acute occlusion after percutaneous transluminal coronary angioplasty: a new approach. *Circulation*. (1983) ; 68:725-732.
- **Huo EY et al.** Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein. *Nature Medecine*. (2003) ; 9:61-67.
- **Hwang SJ et al.** Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation*. (1997) ; 96(12): 4219-25.
- **Inoue T, Hoshi K, Fujito T, Sakai Y, Morooka S, Sohma R.** Early detection of platelet activation after coronary angioplasty. *Coron Artery Dis*. (1996) ; 7:529-534.
- **Ip JH, Fuster V, Israel D, Badimon L, Badimon J, Chesebro JH.** The role of platelets, thrombin and hyperplasia in restenosis after coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol*. (1991) ; 17:77B-88B.
- **Ishikawa Y, Saffitz JE, Mealman TL, Grace AM, Roberts R.** Reversible myocardial ischemic injury is not associated with increased creatine kinase activity in plasma. *Clin Chem*. (1997) ; 43:3, 467-475.
- **ISIS-2 (second International Study of Infarct Survival) collaborative Group.** Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17187 cases of suspected acute myocardial infarction : ISIS-2. *Lancet*. (1988) ; 2:349-360.
- **Jackson SR, Carter JM.** Platelet volume: laboratory measurement and clinical application. *Blood Rev*. (1993) ; 7:104-113.
- **Jaremo P, Lindahl TL, Fransson SG, et al.** Individual variations of platelet inhibition after loading doses of clopidogrel. *J Intern Med*. (2002) ; 252: 233-238.

- **Jennings RB, Murray CE, Steenberg JR, Reiner KA.** Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation.* (1990) ; 82:II2-II12.
- **Joannides R, Richard V, Haefeli WE, Linder L, Lüscher TF, Thuillez C.** Role of basal and stimulated release of nitric oxide in the regulation of radial artery caliber in humans. *Hypertension.* (1995) ; 26 :327-31.
- **Jobin F.** l'hémostase. *Manuel d'hémostase.* 1^{ère} édition, (1995).
- **Johnston GI, Cook RG, McEver RP.** Cloning of GMP-140, an alpha-granule membrane protein of platelets and endothelium: sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. *Cell.* (1989) ; 56:1033-1044.
- **Jordan RE, Wagner CL, Mascelli M, Treacy G, Nedelman MA, Woody JN, Weisman HF, Collier BS.** Preclinical development of c7E3 Fab; a mouse/human chimeric monoclonal antibody fragment that inhibits platelet function by blockade of GPIIb/IIIa receptors with observations on the immunogenicity of c7E3 Fab in humans. In: Horton MA, ed: *Adhesion Receptors as Therapeutic Targets.* Boca Raton, Fla: *CRC Press, Inc.* (1996) ; 281-305.
- **Kenneth KW, Willerson JT.** Monitoring platelet function in glycoproteinIIb/IIIa inhibitor therapy. *Circulation.* (2001) ; 103:2528.
- **Knight CJ, Panesar M, Wilson DJ, Chronos NAF, Patel D, Fox K, Goodall AH.** Different effects of calcium antagonists, nitrates, and beta-blockers on platelet function: possible importance for the treatment of unstable angina. *Circulation.* (1997) ; 95:125-132.
- **Komatsu R, Ueda M, Naruko T, et al.** Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans: macroscopic, histological and immunohistochemical analyses. *Circulation.* (1998) ; 98:224-233.
- **Konstantopoulos K, Kamat SG, Schafer AI, Banez EI, Jordan R, Kleiman NS, Hellums JD.** Shear-induced platelet aggregation is inhibited by in vivo infusion of an anti-glycoprotein IIb/IIIa antibody fragment, c7E3 Fab, in patients undergoing coronary angioplasty. *Circulation.* (1995) ; 91(5):1427-31.
- **Kühne T, Hornstein A, Semple J, Chang W, Blanchette V and Freedman J.** Flow cytometric evaluation of platelet activation in blood collected into EDTA vs. Diatube H, a sodium citrate solution supplemented with theophylline, adenosine, and dipyridamole. *American Journal of Hematology.* (1995) ; 50:40-45.

- **Kunicka JE, Fisher G, Zelmanovic D.** Improved platelet count accuracy: two dimensional platelet analysis. *Amer Clin Lab.* (1998) ; 6-7.
- **Kuta AE, Baum LL.** C-reactive protein is produced by a small number of normal human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med.* (1986) ; 164:321-326.
- **Langford EJ, Brown AS, Wainwright RJ, deBelder AJ, Thomas MR, Smith REA, Radomski MW, Martin JF, Moncada S.** Inhibition of platelet activity by S-nitrosoglutathione during coronary angioplasty. *Lancet.* (1994) ; 2:1458-1460.
- **Langford EJ, Wainwright RJ, Martin JF.** Platelet activation in acute myocardial infarction and unstable angina is inhibited by nitric oxide donors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (1996), 16 :51-55.
- **Laperche T.** Infarctus du myocarde: utilisation en pratique courante des marqueurs cardiaques pour leur prise en charge. *Feuillets de Biologie.* (1997), 38(218) : 49-50.
- **Lasky LA.** Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science.* (1992) ; 258:964-969.
- **Legrand CH, Dubernard V, Kieffer N, Nurden A.** Use of a monoclonal antibody to measure the surface expression of thrombospondin following platelet activation. *Eur J Biochem.* (1988) ; 171:393-399.
- **Levenson J, Giral P, Razavian M, Gariepy J, Simon A.** Fibrinogen and silent atherosclerosis in subjects with cardiovascular risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (1995) ; 15:1263-8.
- **Lewis HD, Davis JW, Archibald DG, Steinke WE, Smitherman TC, Doherty JE, Schnaper HW, LeWinter MM, Inanes E, Pouget Jm, Sabharwal Sc, Chesler E, DeMots H.** Protective effects of aspirin against acute myocardial infarction and death in men with unstable angina. *N Engl J Med.* (1983) ; 309-403.
- **Libby P.** Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation.* (1995) ; 91:2844-2850.
- **Libby P.** Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation.* (2001) ; 104:365-72.
- **Libby P, Ridker PM, Maseri A.** Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* (2002) ; 105(9):1135-43.

- **Lindahl B, Venge P, Wallentin L.** Troponin T identifies patients with unstable coronary artery disease who benefit from long-term antithrombotic protection. Fragmin in Unstable Coronary Artery Disease (FRISC) Study Group. *J Am Coll Cardiol.* (1997) ; 29:43-8.
- **Louvard Y, Haag JC, Belot JP, Villette JM, Laureaux C, Foglietti MJ, Fiet J.** Intérêt du dosage de la myoglobulinémie dans l'infarctus du myocarde récent. *Cœur.* (1985) ; 15(2):185-191.
- **Lozano M, Escolar G, White J, Tassies D, Ordinas A, Diaz-Ricart M.** Redistribution of membrane glycoproteins in platelets activated under flow conditions. *Blood Coag Fibrinolysis.* (1996) ; 7:214-7.
- **Luscher MS, Thygesen K, Ravikilde J, Heickendorff L, for the TRIM Study Group.** Applicability of cardiac troponin T and I for the early risk stratification in unstable coronary artery disease. *Circulation.* (1997) ; 96:2578-2585.
- **Macey MG, Carty E, Webb L, Chapman ES, Zelmanovic D, Okrongly D, Rampton, DS and Newland AC.** Use of mean platelet component to measure platelet activation on the ADVIA 120 haematology system. *Cytometry.* (1999) ; 38:250-255.
- **Machecourt J.** Athérosclérose : épidémiologie et physiopathologie. Faculté de Médecine de Grenoble (2002).
- **Madan M, Berkowitz SD, Christie DJ, Smit AC, Sigmon KN, Tcheng JE.** Determination of platelet aggregation inhibition during percutaneous coronary intervention with the platelet function analyzer PFA-100. *Am Heart J.* (2002) ; 144(1):151-8.
- **Mair J, Artner DE, Lechleitner P, Smidt J, Wagner I, Dienstl F, Puschendorf B.** Cardiac troponin T in diagnosis of acute myocardial infarction. *Clin Chem.* (1991) ; 37 (6) :845-852.
- **Mair J, Morandell D, Genser N, Lechleitner P, Dienstl F, Puschendorf B.** Equivalent early sensitivities of myoglobin, creatine kinase MB mass, creatine kinase isoform ratios, and cardiac troponins I and T for acute myocardial infarction. *Clin Chem.* (1995) ; 41(9):1266-1272.
- **Mak KH, Belli G, Ellis SG, Moliterno DJ.** Subacute stent thrombosis: evolving issues and current concepts. *J Am Coll Cardiol.* (1996) ; 27:494-503.

- **Mammen EF, Comp PC, Gosselin R, Greenberg C, Hoots WK, Kessler CM, Larkin EC, Liles D & Nugent DJ.** PFA-100 TM : a new method for assessment of platelet dysfunction. *Seminars in Thrombosis and Haemostasis*. (1998) ; 24:195–202.
- **Mandelkorn JB, Wolf NM, Singh S, Shechter JA, Kersh RI, Rodgers DM, Workman MB, Bentivoglio LB, Laporte SM, Meister SG.** Intracoronary thrombus in nontransmural myocardial infarction and in unstable angina pectoris. *Am J Cardiol*. (1983) ; 52:1-6.
- **Mascelli MA, Worley S, Veriabo NJ, Lance ET, Mack S, Schaible T, Weisman HF, Jordan RE.** Rapid assessment of platelet function with a modified whole-blood aggregometer in percutaneous transluminal coronary angioplasty patients receiving anti-GP IIb/IIIa therapy. *Circulation*. (1997) ; 96:3860-3866.
- **Mascelli MA, Lance ET, Damaraju L, Wagner CL. Weisman HF. Jordan RE.** Pharmacodynamic profile of short-term abciximab treatment demonstrates prolonged platelet inhibition with gradual recovery from GP IIb/IIIa receptor blockade. *Circulation*. (1998) ; 97(17):1680-8.
- **McBride W, Lange RA, Hillis LD.** Restenosis after successful coronary angioplasty. *N Engl J Med*. (1988) ; 26:1734-1737.
- **Mc Ever RP.** *Blood cells*. (1990) ; 16:73-83.
- **McEver RP.** Leukocyte-endothelial cell interactions. *Curr Opin Cell Biol*. (1992) ; 4:840-849.
- **McGregor JL.** Rôle de la sélectine P (CD62P) dans les interactions des cellules endothéliales et des plaquettes activées avec les leucocytes. *Hématologie*. (1995) ; 1 (2):83-7, Revues.
- **McPhedran P, Clyne LP, Ortoli NA, Gagnon PG, Sanders FJ.** Prolongation of the activated partial thromboplastin time associated with poor venipuncture technique. *Am J Clin Pathol*. (1974) ; 62:20.
- **Mehta SR, Yusuf S.** The Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events (CURE) trial programme ; rationale, design and baseline characteristics including a meta-analysis of the effects of thienopyridines in vascular disease. *Eur Heart J*. (2000) ; 21(24): 2033-2041.

- **Mezzano D, Hwang K, Catalano P, Aster RH.** Evidence that platelet buoyant density, but not size, correlated with platelet age in man. *Am. J. Hematol.* (1981), 11:61.
- **Michels KB, Yusuf S.** Does PTCA in acute myocardial infarction affect mortality and reinfarction rate? A quantitative overview (meta-analysis) of the randomized clinical trials. *Circulation.* (1995) ; 91:476-485.
- **Michelson AD.** Platelet activation by thrombin can be directly measured in whole blood through the use of the peptide GPRP and flow cytometry: Methods and clinical applications. *Blood Coagulation and Fibrinolysis.* (1994) ; 5:121-131.
- **Michelson AD, Barnard MR, Hechtman HB, et al.** In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1996) ; 93:11877-11882.
- **Michelson AD.** Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood.* (1996) ; 87:4925-4936.
- **Michelson AD & Furman MI.** Laboratory markers of platelet activation and their clinical significance. *Current Opinion in Hematology.* (1999) ; 6:342-348.
- **Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Frelinger AL, Furman MI.** Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Methods.* (2000) ; 21(3): 259-270.
- **Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI.** Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation.* (2001) ; 104(13):1533-7.
- **Mickelson JK, Lakkis NM, Villarreal-Levy G, et al.** Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: a mechanism for recurrent disease? *J Am Coll Cardiol.* (1996) ; 28: 345-353.
- **Mills DCB.** The role of cyclic nucleotides in platelets. In Keabian JW, Nathanson JA (eds): "cyclic nucleotides Part II. *Physiology and Pharmacology*" Berlin: Springer-Verlag, (1982) ; 723-761.
- **Mills DC, Puri R, Hu CJ, Minniti C, Grana G, Freedman MD, Colman RF, Colman RW.** Clopidogrel inhibits the binding of ADP analogues to the receptor mediating inhibition of platelet adenylate cyclase. *Arteriosc Thromb.* (1992) ; 12:430-436.

- **Mizuno K, Satomura K, Miyamoto A, Arakawa K, Shibuya T, Arai T, Kurita A, Nakamura H, Ambrose JA.** Angioscopic evaluation of coronary-artery thrombi in acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* (1992) ; 326:287-291.
- **Monsuez J J.** "Résistance à l'aspirine". *Circulation.* (2002) ; 105 : 1650-5 et 1620-2.
- **Montalescot G.** *Annales françaises de cardiologie et d'angiologie.* (2000) ; 49:60-2.
- **Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT.** Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation.* (1994) ; 90:775-8.
- **Mullaney PF, Van Dilla MA, Coulter JR, Dean PN.** Cellsizing :a light scattering photometer for rapid volume determination. *Rev Sci instrum.* (1969) ; 40 :1029-1032.
- **Müller I, Seyfarth M, Rüdiger S, Wolf B, Pogatsa-Murray G, Schömig A.** Effect of a high loading dose of clopidogrel on platelet function in patients undergoing coronary stent placement. *Heart.* (2001) ; 85:92-3.
- **Müller I, Besta F, Schulz C, Massberg S, Schömig A, Gawaz M.** Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thrombosis and Haemostasis.* (2003) ; 89:783-787.
- **Myers D, Wroblewski S, Londy F, Fex B, Hawley A, Schaub R, Greenfield L, Wakefield T.** New and effective treatment of experimentally induced venous thrombosis with anti-inflammatory rPSGL-Ig. *Thromb Haemost.* (2002) ; 87(3):374-82.
- **Myocardial infarction redefined.** A consensus document of The Joint European Society of Cardiology/ American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction. *Eur Heart Journal.* (2000) ; 21:1502.
- **Myocardial infarction redefined.** A consensus document of the joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol.* (2000) ; 36:959-69.
- **National Cholesterol Education Program.** Second report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II). Bethesda: National Heart, Lung, and Blood Institute, (1993). NIH publication no.93-3095.

- **Neufeld M, Nowak-Gottl U, Junker R.** Citrate-Theophylline-Adenosine-Dipyridamole buffer is preferable to citrate buffer as an anticoagulant for flow cytometric measurements of platelet activation. *Clin Chem.* (1999) ; 45: 2030-2033.
- **Neumann FJ, Gawaz M, Dickfeld T, Wehinger A, Walter H, Blasini R, Schomig A :** Antiplatelet effect of ticlopidine after coronary stenting. *J Am Coll Cardiol.* (1997) ; 29:1515-1519.
- **Nicholson NS, Panzer-Knodle SG, Haas NF.** Assessment of platelet function assays. *Am Heart J.* (1998) ; 135:S170-S178.
- **Nieuwenhuis HK, van Oosterhout JJG, Rozemuller E, van Iwaarden F, Sixma JJ.** Studies with a monoclonal antibody against activated platelets: evidence that a secreted 53,000-molecular weight lysosome-like granule protein is exposed on the surface of activated platelets in the circulation. *Blood.* (1987) ; 70:838-845.
- **Nurden AT, Macchi L, Bihour C, Durrieu C, Besse P, Nurden P.** Markers of platelet activation in coronary heart disease patients. *Eur J Clin Invest.* (1994) ; 24:42-5.
- **Nurden P, Durrieu-Jaïs C, Nurden A.** Applications cliniques actuelles d'une activation plaquettaire par cytométrie en flux--Sang *Thrombose Vaisseaux.* (1997) ; 9(7):441-8, Mini-revues.
- **Olson JD, Arkin CF, Brandt JT, et al.** College of American Pathologists Conference XXXI on Laboratory Monitoring of Anticoagulant Therapy. Laboratory monitoring of unfractionated heparin therapy. *Arch Pathol Lab Med.* (1998) ; 122:765-816.
- **Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, et al.** Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* (1992) ; 359 :848-851.
- **Palmer RM, Ashton DS, Moncada S.** Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* (1988) ; 333:664-6.
- **Paterson JC.** Capillary rupture with intimal hemorrhage as a causative factor in coronary thrombus. *Arch Pathol Lab Med.* (1938) ; 25 :474-487.
- **Philippon C.** Myoglobine, CK-MB masse, Troponine I : caractéristiques comparées. *Feuillets de Biologie.* (1997) ; 38 (217):41-45.

- **Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA.** The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood.* (1988) ; 71:831-43.
- **Plow EF, Ginsburg MH.** Cellular adhesion : GPIIb-IIIa as a prototypic adhesion receptor. In : Collier BS, ed. *Progress in Hemostasis and Thrombosis.* Philadelphia, pa :WB Saunders Co. (1989) ; 117-156.
- **The Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management (PRISM) Study Investigators.** A comparison of aspirin plus tirofiban with aspirin plus heparin for unstable angina. *N Engl J Med.* (1998) ; 338 :1498-1505.
- **Quilici J, Gallo R.** physiopathologie des syndromes coronariens aigus. *Ann Cardiol Angéiol.* (1999) ; 48(9-10):611-23.
- **Rauch U, Osende JI, Fuster V, Badimon JJ, Fayad Z, Chesebro JH.** Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences. Review, *Ann Intern Med.* (2001) ; 134(3): 224-238.
- **Ray MJ, Carroll PA, Just SJ, Hawson GA.** A low volume container suitable for monitoring the aPTT of heparinized patients. *Blood coagulation Fibrinolysis.* (1993) ; 4:805-7.
- **Revenko I, Manchon M.** Intérêt actuel de la CK-MB dans le diagnostic de l'infarctus du myocarde. *Lyon Pharmaceutique* (1993) ; 44 (2):83-90.
- **Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH.** Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med.* (1997) ; 336:973-979.
- **Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH.** Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation.* (1998) ; 97 :425-8.
- **Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N.** C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* (2000) ; 342: 836-843.
- **Rinder HM, Bonan JL, Rinder CS, et al.** Dynamics of leukocyte-platelet adhesion in whole blood. *Blood.* (1991) ; 78:1730-1737.
- **Ross R.** The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* (1993) ; 362:801-9.

- **Ross R.** Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med.* (1999) ; 340: 115–126.
- **Rossi F, Rossi E, Pareti FI, Colli S, Tremoli E, Gallo L.** In vitro measurement of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade by abciximab : interindividual variation and increased platelet secretion . *Haematologica.* (2001) ; 86:192-198.
- **Ruggeri ZM.** New insights into mechanisms of platelet adhesion and aggregation. *Semin Hematol.* (1994) ; 31:229-39.
- **St Louis P, Gandhi S.** Cardiac contusion and creatine kinase MB: a pertinent case history and brief review of the utility of CK-MB. *Clin. Biochem.* (1994) ; 27(2):105-111.
- **Saphir O, Priest WS, Hamburger WW, Katz LN.** Coronary arteriosclerosis, coronary thrombosis, and the resulting myocardial changes : an evaluation of their respective clinical pictures including the electrocardiographic records, based on the a anatomical findings. *Am Heart J.* (1935) ;10 :567-595.
- **Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM.** Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell.* (1998) ; 94:657-666.
- **Schafer AI.** Antiplatelet therapy. *Am J Med.* (1996) ; 101(2):199-209.
- **Scharf R, Tomer A, Marzec U, Teirstein P, Ruggeri Z, Harker L.** activation of platelets in blood perfusing angioplasty-damaged coronary arteries. *Arterioscler Thromb.* (1992) ; 12:1475-87.
- **Schatz RA, Baim DS, Leon MB, Ellis SG, Goldberg SL, Hirshfield JW, Cleman MW, Cabin HS, Walker CM, Stagg J, Buchbinder M, Teirstein PS, Topol EJ, Savage M, Perez JA, Curry RC, Whitworth H, Sousa JE, Tio FO, Almagor Y, Ponder R, Penn IM, Leonard B, Levine SL, Fish DR, Palmaz JC.** Clinical experience with the Palmaz-Schatz coronary stent: initial results of a multicenter study. *Circulation.* (1991) ; 83:148-161.
- **Schlossman, S.F., Boumsell, Gilks, W., Harlan, J. M., Kishimoto, T., Morimoto, C., Ritz J., Shaw, S., Silverstein, R. L., Springer, T. A., Tedder, T.F., and Todd, R.F.** *Blood.* (1993). 83, 879-880.

- **Schmitz G, Rothe G, Ruf A, Barlage S, Tschöpe D, Clementson KJ, et al.** European Working Group on Clinical Cell Analysis: consensus protocol for the flow cytometric characterization of platelet function. *Thrombosis Haemostasis*. (1998) ; 79:885-896.
- **Schneider D, Tracy P, Mann K, et al.** Differential effects of anticoagulants on the activation of platelet ex vivo. *Circulation*. (1997) ; 96:2877–2883.
- **Schomig A, Neumann F-J, Kastrati A, Schulen H, Blasini R, Hadamitsky M, Walter H, Zitzmann-Roth E-M, Richardt G, Alt E, Schmitt C, Ulm K.** A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents. *N Engl J Med*. (1996) ; 334:1084-1089.
- **Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, et al.** Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture? *Circ Res*. (1997) ; 81:448-54.
- **Schreiner W, Mueller MR, Premauer W, Wolner E.** Computerized Acquisition and Evaluation of Whole Blood Aggregometry Data. *Comput Biol Med*. (1991) ; 21: 435-441.
- **Schrör K.** antiplatelet drugs. A comparative review. *Drugs*. (1995) ; 50 :7-28.
- **Schultheiss HP, Tschöpe D, Esser J, Schwippert B, Roesen P, Nieuwenhuis HK, Schmidt-Soltan C, Strauer B.** Large platelets continue to circulate in an activated state after myocardial infarction. *Eur J clin Invest*. (1994) ; 24(4):243-7.
- **Schwartz L, Bourassa MG, Lesperance J, et al.** Aspirin and dipyridamole in the prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med*. (1988) ; 318:1714-9.
- **Serruys PW, Luijten HE, Beatt KJ, et al.** Incidence of restenosis after successful coronary angioplasty: a time-related phenomenon: a quantitative angiographic study in 342 consecutive patients at 1, 2, 3, and 4 months. *Circulation*. (1988) ; 77:361–371.
- **Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, Emanuelsson H, Marco J, Legrand V, Materne P.** A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*. (1994) ; 331:489-495.
- **Shebuski RJ, Kilgore KS.** Role of inflammatory mediators in thrombogenesis. Review. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*. (2002) ; 300(3) :729-35.

- **Sherman CT, Litvack F, Grundfest W, Lee M, Hickey A, Chaux A, Kass R, Blanche C, Matloff J, Morgenstern L, Ganz W, Swan HJC, Forrester J.** Coronary angioscopy in patients with unstable angina pectoris. *N Engl J Med.* (1986) ; 315:913-919.
- **Simoons ML, de Boer MJ, van den Brand MJ, van Mittenburg AJ, Hoorntje JC, Hegndrickx GR, van der Wieken LR, de Bono D, Rutsch W, Schaible TF, Weisman HF, Klotwijk P, Nijssen K, Stibbe J, de Feyter PJ.** for the European Cooperative Study Group. Randomized trial of a GPIIb/IIIa platelet receptor blocker in refractory unstable angina. *Circulation.* (1994) ; 89:596-603.
- **Sixma JJ, Van Zanten GH, Huizinga EG, Van der Plas RM, Verkley M, Wu YP, Gros P & De Groot PG.** Platelet adhesion to collagen: an update. *Thrombosis and Haemostasis.* (1997) ; 78:434-438.
- **Smalling RW, Vernon AH.** Pathophysiological Insight Into the Possible Optimal Therapies for Acute Myocardial Infarction and Unstable Angina. *Circulation.* (1998) ; 97(1) :10-11.
- **Smith MP, Cramer EM, Savidge GF.** Megakaryocytes and platelets in alpha-granule disorders. *Clin Haematol.* (1997) ; 10:125-48.
- **Smith J, Steinhubl S, Lincoff A, et al.** Rapid platelet-function assay. An automated and quantitative cartridge-based method. *Circulation.* (1999) ; 99:620-625.
- **Smitherman TC, Milam M, Woo J, Willerson JT, Frenkel EP.** Elevated beta thromboglobulin in peripheral venous blood of patients with acute myocardial ischaemia : direct evidence for enhanced platelet reactivity in vivo. *Am J Cardiol.* (1981) ; 48:395-402.
- **Spielberg C, Schnitzer L, Linderer T, Schroder R.** Influence of catheter technology and adjuvant medication on acute complications in percutaneous coronary angioplasty. *Z Kardiol.* (1990) ; 79: 450-454.
- **Stanworth SJ, Denton K, Monteath J, Patton WN.** Automated counting of platelets on the Bayer ADVIA 120 analyser. *Clin Lab Haematol.* (1999) ; 21:113-117.
- **Steinberg D, Lewis A.** Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation.* (1997) ; 95(4) : 1062-71.
- **Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF.** A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol.* (1985) ; 101:880-886.

- **The Task Force on management of acute myocardial infarction of the European society of cardiology.** Acute myocardial infarction : prehospital and hospital management. *Eur Heart J.* (1996) ; 17:43-63.

- **Tcheng JE, Ellis SG, George BS, Kereiakes DJ, Kleiman NS, Talley JD, Wange AL, Weisman HF, Califf RM, Topol EJ.** Pharmacodynamics of chimeric glycoprotein IIb/IIIa integrin antiplatelet antibody Fab 7E3 in high-risk coronary angioplasty. *Circulation.* (1994) ; 90:1757-1764.

- **The EPIC Investigators.** Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty. *N Engl J Med.* (1994) ; 330(14):956-961.

- **Topol EJ, Byzova TV, Plow EF.** Platelet GPIIb/IIIa blockers. *Lancet.* (1999) ; 353:227-231.

- **Topol E, Yadav J.** Recognition of the importance of embolization in atherosclerotic vascular disease. *Circulation.* (2000) ; 101:570-81.

- **Tomoda H, Aoki N.** Prognostic value of C-reactive protein levels within six hours after the onset of acute myocardial infarction. *Am Heart J.* (2000) ; 140(2):324-8.

- **Thompson CM, Steinhubl SR.** Monitoring of Platelet Function in the Setting of GPIIa/IIIb Inhibitor Therapy. *Current Interventional Cardiology. Reports* (1999) ; 1:270-277.

- **Toss H, Lindahl B, Siegbahn A, Wallentin L.** Prognostic influence of increased fibrinogen and C-reactive protein levels in unstable coronary artery disease. *Circulation.* (1997) ; 96:4204-10.

- **Toschi VGR, Lettino M, Fallon JT.** Tissue factor predicts the thrombogenicity of human atherosclerotic components. *Circulation.* (1997) ; 95:594-9.

- **Trip MD, Cats VM, Van capelle FJL, Vreeken J.** Platelet hyperreactivity and prognosis in survivors of myocardial infarction. *N Engl J Med.* (1990) ; 322(22):1549-1554.

- **Tschoepe D, Esser J, Schwippert B, Rosen P, Kehrel B, Nieuwenhuis HK, Gries FA.** Large platelets circulate in an activated state in diabetes mellitus. *Semin Thromb Hemost.* (1991) ; 17:433-439.

- **Tschoepe D, schultheib HP, Kolarov P, Schwippert B, Dannehl K, Nieuwenhuis HK, et al.** Platelet membrane activation markers are predictive for increased risk of acute ischemic events after PTCA. *Circulation*. (1993), 88:37-42.
- **Tschoepe D, Driesch E, Schwippert B, Lampeter EF.** Activated platelets in subjects at increased risk of IDDM. *Diabetologia*. (1997) ; 40:573-577.
- **Turner NA, Moake JL, Kamat SG, Schafer AI, Kleiman NS, Jordan R, McIntire LV.** Comparative real-time effects on platelet adhesion and aggregation under flowing conditions of in vivo aspirin, heparin, and monoclonal antibody fragment against glycoprotein IIb-IIIa. *Circulation*. (1995) ; 91:1354-1362.
- **Turpin G, Bruckert T .** Athérome. *Impact intern* (1994) ; 15 : 177-81.
- **Tycko DH, Metz MH, Epstein EA, Grinbaum A.** Flow cytometric light scattering measurement of red cell volume and hemoglobin concentration. *Appl Optics*. (1985) ; 24 :1355-1360.
- **Van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, et al.** Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterised by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*. (1994) ; 89:36-44.
- **Van der Wal AC, Piek JJ, de Boer OJ, et al.** Recent activation of the plaque immune response in coronary lesions underlying acute coronary syndromes. *Heart*. (1998) ; 80:14-8.
- **Weiss HJ.** Platelets and ischemic heart disease. *N Engl J Med*. (1980) ; 302(4):225-226.
- **Wesley RB et al.** Extracellular matrix modulates macrophage functions characteristic to atheroma. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*. (1998) ; 18:432-40.
- **White MM, Jennings LK.** Platelet Protocols: *Research and Clinical Laboratory Procedures*. Academic Press, San Diego, (1999).
- **Wilentz JR, Sanborn TA, Haudenschild CC, Vareli CR, Ryan TG, Faxon DP.** Platelet accumulation in experimental angioplasty: time course and relation to vascular injury. *Circulation*. (1987) ; 75:635-642.
- **Willerson JT, Golino P, Eidt J, Campbell WB, Buja LM.** Specific platelet mediators and unstable coronary artery lesions : experimental evidence and potential clinical implications. *Circulation*. (1989) ; 80:198-205.

- **Wu KK.** Platelet activation and arterial thrombosis. *Lancet.* (1994) ; 344:991-995.
- **Zeller, J. A., Tschoepe, D., and Kessler, C.** *Thrombosis Haemostasis.* (1999) ; 81:373-377.
- **Zelmanovic D, Hetherington EJ.** Automated analysis of feline platelets in whole blood, including platelet count, mean platelet volume, and activation state. *Vet Clin Pathol.* (1998) ; 27:2-9.
- **Zelmanovic D, Colella GM, Hetherington, EJ, Chapman ES, Paseltiner L, inventors.** Automated method and device for identifying and quantifying platelets and for determining platelet activation state using whole blood samples. US Patent 5,817,519, (1998).
- **Zimmerman G A, S M Prescott, T M McIntyre.** Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunol. Today* (1992) ; 13:93-100.
- **Zitoun R, Samama MM, JP Marie.** *Manuel d'hématologie.* 5^{ème} édition, (1998).

ANNEXE I

Matériels

▪ Réactifs

Les réactifs utilisés lors de notre étude sont les suivants : Thrombine Plasmatique humaine (Sigma): Formaldéhyde, contrôle plaquettes, anticorps IgG1 PE de souris ; contrôle plaquettes, anticorps IgG1 FITC de souris, anticorps monoclonaux, CD42a (GPIIb/IX) FITC-conjugate ; CD61 (GPIIb/IIIa) FITC-conjugate; CD62 (GMP-140) PE-conjugate ; et des billes de calibrations (Becton Dickinson Immunocytometry Systems). H-Gly-Pro-Arg-Pro-OH, et sérum albumine bovine (Calbiochem), ADVIA®120 Hematology OPTIpoint, SETpoint calibrator, TEST point contrôles, bas, normaux, et élevés et les réactifs (Bayer Diagnostic).

▪ Autres matériels

Les Tubes en Polypropylène et en Polystyrène, les tubes VACUTAINER avec anticoagulants, Citrate de sodium (0.129M), CTAD, et K₂EDTA ont été obtenus à partir des systèmes VACUTAINER (Becton Dickinson).

- **Instruments de mesure**

FACScan: Fluorescence Activated Cells Sorter: Becton Dickinson /FACStation: PowerPC Macintosh G3/300MHZ, équipés d'un laser argon, et d'un logiciel d'analyse CellQuest (Becton Dickinson Immunocytometry Systems). Le système hématologique ADVIA®120 (Bayer Diagnostics). L'Immunolalyser (Bayer Diagnostics). Nephelometric technology (BN ProSpec) (Dade Behring).

ANNEXE II

Centre universitaire de santé de l'Estrie

FORMULAIRE DE CONSENTEMENT ÉCLAIRÉ PROJET DE RECHERCHE

ÉVALUATION ET UTILISATION DE L'ACTIVATION PLAQUETTAIRE COMME MARQUEUR DE RISQUE DANS LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES.

Patients traités avec des médicaments antiplaquettaires

Chercheurs

Dr Andrew Grant
Dr Charaf Ahnadi
Dr Mariette Lépine-Martin
Dr André Gervais
Dr Serge Lepage

Commanditaire

Bayer Corporation
511 Benedict Avenue
Tarrytown, New York (USA) 10591

1. OBJECTIFS

Nous vous demandons de participer à une étude scientifique qui aidera peut-être les patients, qui comme vous, souffrent de douleur à la poitrine (angine). L'angine de poitrine est une maladie caractérisée par des crises douloureuses thoraciques d'origine cardiaque. On peut observer différentes manifestations de ces crises douloureuses tout en présentant un électrocardiogramme normal. Il n'est pas toujours facile, dans les salles d'urgence, de prédire si le patient est à haut risque cardiaque ou pas.

Les plaquettes sont des cellules sanguines importantes dans la formation des caillots sanguins. Avec des protéines de la coagulation appelées facteurs de coagulation, les plaquettes contribuent à arrêter le saignement après une coupure accidentelle ou chirurgicale. Dans certaines maladies dont les maladies cardiovasculaires, les plaquettes deviennent trop actives et entraînent la formation de caillots dans de petites artères du cœur, du cerveau ou des jambes. Dans ces conditions, les médecins peuvent prescrire des médicaments qui diminuent l'activité des plaquettes. Dans cette étude, nous désirons étudier l'état des plaquettes sanguines suite à l'administration des médicaments antiplaquettaires. Parce que vous prenez un de ces médicaments, vous êtes éligible à cette étude réalisée avec une population de 40 patients. Au cours de la même étude, chez 150 patients avec douleur à la poitrine, on étudiera la Troponine (substance détectée dans le sang de patients souffrant de douleur cardiaque) et la coagulation du sang par les plaquettes sanguines.

2. RÉCOLTE DES SPÉCIMENS

Lors de votre hospitalisation, à l'occasion des prélèvements sanguins de routine, quatre échantillons de sang additionnels de 5 ml (4 c. à thé) seront prélevés à différents temps selon le médicament administré:

Si vous recevez le médicament antiplaquettaire ReoPro, un premier prélèvement sera fait avant l'administration du médicament et trois autres prélèvements seront réalisés 10 min, 2 heures et 24 heures après administration du médicament.

Si vous recevez le médicament antiplaquettaire Clopidogrel, un premier prélèvement sera fait avant l'administration du médicament et trois autres prélèvements seront réalisés 2 heures 5 heures et 24 heures après administration du médicament.

3. RISQUES

Les prélèvements sanguins peuvent provoquer certains malaises tels des étourdissements. À l'occasion des douleurs ou des ecchymoses locales (des bleus) peuvent aussi survenir au site de prélèvement. Ces prélèvements sanguins supplémentaires n'ajoutent aucun risque additionnel à la procédure effectuée de routine.

4. BÉNÉFICE DE CETTE RECHERCHE

Votre participation à cette étude ne vous sera pas directement bénéfique personnellement mais pourrait l'être pour d'autres puisque nous espérons que cette étude permettra de monitorer l'effet des médicaments antiplaquettaires.

5. CONFIDENTIALITÉ ET CONSULTATION DU DOSSIER MÉDICAL

Nous vous demandons le consentement de consulter votre dossier médical pour comparer les résultats des examens. Seuls les membres de l'équipe de recherche y auront accès. Les échantillons seront codés et votre nom ne sera jamais dévoilé. Les renseignements consignés dans votre dossier demeureront strictement confidentiels.

6. DROIT D'ABANDON

Votre participation à ce projet est volontaire et vous être libre de vous en retirer en tout temps, sans aucun préjudice. Si vous décidez de ne plus participer, veuillez en aviser le chercheur principal ou l'un de ses assistants au numéro apparaissant en bas de cette page.

7. FORMULAIRE DE CONSENTEMENT

J'ai lu ce document attentivement avant de le signer et on a répondu de façon satisfaisante à toutes mes questions. Je sais que je peux me retirer de l'étude en tout temps sans préjudice. En conséquence, j'accepte librement de participer à ce projet.

Nom du patient	Signature du patient	Date
----------------	----------------------	------

Nom du témoin	Signature du témoin	Date
---------------	---------------------	------

Nom du chercheur	Signature du chercheur	Date
------------------	------------------------	------

Pour toute autre information, vous pouvez communiquer avec le Centre de Recherche et d'Évaluation en Diagnostique au (819) 820-6812 ou (819) 346-1110, poste 15594 et demander Dr Charaf Ahnadi ou Véronique Poisson, assistante de Recherche.

Si vous avez des questions concernant votre participation en tant que sujet de cette étude, vous pouvez rejoindre le représentant du Comité de Déontologie de la recherche sur l'humain du CUSE au (819) 346-1110, poste 12856.

ANNEXE III



24 MARS 2000 *AS*

Le 22 mars 2000

Dr Andrew Grant
Biochimie clinique
CUSE, Site Fleurimont

OBJET: Projet # 00-11

Évaluation et utilisation de l'activation plaquettaire comme marqueur de risque dans les maladies cardiovasculaires.

- ☒ Protocole complet: ADVIA 120
- ☒ Formulaire de consentement: 21 mars 2000
- ☐ Amendement #
- ☐ Autre:

Dr Grant,

Nous aimerions, par la présente, vous aviser que votre protocole de recherche cité en rubrique a été approuvé par le(s) comité(s) ou conseil(s) au(x)quel(s) nous l'avons soumis pour évaluation.

Les conditions requises à la réalisation de ce projet de recherche étant réunies, il nous fait plaisir de vous autoriser à débiter l'étude.

Je vous transmets ci-joint le formulaire d'approbation du Comité de déontologie de la recherche sur l'humain que vous pourrez faire suivre à votre organisme commanditaire ou subventionnaire.

Vous souhaitant tout le succès escompté dans le déroulement de cette étude, je vous prie de croire à l'expression de mes sentiments les plus distingués.

Jean-Pierre Tétrault, M.D.
Directeur adjoint à la recherche clinique
Centre de recherche clinique du CUSE

/fl

Dr Charaf Ahnadi

cc:

APPROBATION
**Comité de déontologie de la recherche sur l'humain de la faculté de médecine et
du Centre universitaire de santé de l'Estrie.**

Ce comité est formé par:

ASSELIN, Claude, Ph.D., Dept. d'Anatomie-biologie cellulaire, Faculté de médecine
AURAY-BLAIS, Christiane, B.Sc., LL.M., Service de médecine génétique, CUSE
BÉNARD, Bernard, M.D. endocrinologue, à la retraite
BLACKBURN, Pierre, professeur de philosophie et d'éthique, CEGEP de Sherbrooke, représentant du public
de BRUM-FERNANDES, Artur, M.D., Ph.D., pr. adjoint, service de rhumatologie, Faculté de médecine, vice-président
CLOUTIER, Sylvie, B.Pharm., M.Sc., pharmacienne, CUSE
DESROSIERS, Nicole, Infirmière, Programme de dépistage du cancer du sein, CUSE
DORION, Dominique, M.D., pr. agrégé, service d'oto-rhino-laryngologie, Faculté de médecine
FORTIN, Marielle, infirmière, système informatisé des dossiers cliniques, CUSE
GUAY, André, infirmier-coordonnateur, représentant du CA du CUSE
LAMBERT, Cécile, Ph.D., pr. titulaire, Département des sciences infirmières, Faculté de médecine, présidente
LANGIS, Hélène, M.D., département de pédiatrie, CUSE
LANGLAIS, Albert, M.D., département de psychiatrie, CUSE
LEMIRE, Francyn, secrétaire médicale, Centre de recherche clinique, secrétaire
MÉNARD, Père Jean-René, O.S.B., représentant du public
ROBB, John, M.D., département de médecine interne, CUSE
ROUSSEAU, Éric, Ph.D., département de physiologie-biophysique, Faculté de médecine, vice-président
SAMOISSETTE, Me Line, LL.B., aide juridique, ville de Sherbrooke
VÉZINA, Yves, M.D., service de pneumologie

Approbation demandée par: Dr Andrew Grant
Dr Charaf Ahnadi

pour

- ☐ Protocole complet: ADVIA 120
☒ Formulaire de consentement: 21 mars 2000
☐ Amendement #
☐ Autre:

Titre du protocole CRC # 00-11-M1

Évaluation et utilisation de l'activation plaquettaire comme marqueur de risque dans les maladies cardiovasculaires.

Signé par:



**Cécile Lambert Ph.D.
Présidente du Comité**

22 mars 2000

Date

Il est rappelé à l'investigateur principal:

- a) qu'il doit rapporter au Comité tout problème majeur intervenant dans la réalisation du protocole;
- b) qu'il doit rapporter aux sujets participant aux recherches tout résultat ou information susceptibles de modifier leur consentement;
- c) qu'il doit remettre au sujet une copie du formulaire de consentement identique à l'original signé par celui-ci;
- d) que tous les patients ou sujets sains participant à un projet de recherche doivent avoir un dossier au CUSE.